

AF488-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒

【产品简介】 ◆在磷脂酰丝氨酸(PS)是一种带负电荷的磷脂，正常细胞中，PS只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，细胞膜PS由脂膜内侧翻向细胞膜外侧，使PS暴露在细胞膜外表面。Annexin V是一种分子量为 35-36kD的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力，故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此AnnexinV被公认为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。

◆将AnnexinV进行绿色荧光AF488标记，以标记了的AnnexinV作为探针，利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸染料，它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜，但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞，PI能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此采用AnnexinV与 PI双染的方法，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

【货 号】 C1106

【规 格】 20T/50T/100T

【包装清单】

产品编号	产品名称	20T	50T	100T
1	AF488-Annexin V	100ul	250ul	500ul
2	Propidium Iodide, PI	200ul	500ul	1000ul
3	Binding Buffer(4×)	4ml	10ml	20ml

【保存条件】 4℃保存，有效期一年。

【操作步骤】 1、细胞样品的准备

悬浮细胞：

(1) 收集细胞至离心管中，1000-2000rpm离心5min，小心去除上清。

(2) 用1ml 4℃预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数，1000-2000rpm离心5min，小心吸除上清。

(3) 再加入1ml 4℃预冷的 PBS 重悬细胞，1000-2000rpm离心5min，小心吸除上清

贴壁细胞：

(1) 吸出细胞培养液至离心管中，PBS 洗涤贴壁细胞一次，加入适量不含EDTA的胰酶细胞消化液消化细胞。

(2) 室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时，吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化。

(3) 加入步骤(1)中收集的细胞培养液，稍混匀，转移到离心管内，1000-2000rpm离心5min，小心吸除上清。

注意：加入步骤(1)中的细胞培养液一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞，另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶；残留的胰酶会消化并降解后续加入的AF488-Annexin V导致染色失败。

(4) 用1ml 4℃预冷PBS轻轻重悬细胞并计数，1000-2000rpm离心5min，小心吸除上清。

(5) 再加入1ml 4℃预冷的 PBS 重悬细胞，1000-2000rpm离心5min，小心吸除上清

2、用去离子水按 1: 4 稀释 Binding Buffer (4ml Binding Buffer+12ml 去离子水)；

3、用适当体积的结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为 1×10^6 /ml；

4、取100 μ l的细胞悬液于5 ml流式管中，加入5 μ l AF488-Annexin V，轻轻混匀；

5、室温(20-25℃)避光孵育 10min；

6、上机前5min加入10ul碘化丙啶溶液，轻轻混匀；

7、上机前在反应管中补加 400ul PBS 重悬细胞，避光保存，随即进行流式细胞仪(FACS)检测，AF488-Annexin V为绿色荧光，PI 为红色荧光。

【注意事项】

1、微量试剂需离心数秒，将试剂收集至管底后再开盖取用。

2、Propidium Iodide (PI) 有毒，操作时要带手套，使用时避免与皮肤，眼睛和黏膜接触。

3、AF488-Annexin V 中含有剧毒成分叠氮化钠(NaN_3)，操作时要带手套，使用时避免与皮肤，眼睛和黏膜接触。

4、本试剂盒用于检测活细胞，流式细胞仪检测时，细胞数量不应低于 1×10^6 。

5、染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。

6、Annexin V 检测凋亡细胞的方法适用于悬浮生长的细胞，如：淋巴细胞等细胞的检测。对于贴壁生长的细胞，由于在胰酶等消化处理过程中会造成细胞膜的损伤，会造成较高的假阳性，而用细胞刮刀会造成细胞粘连成团，而影响检测，可将胰酶消化后的细胞保存在含 2%BSA 的 PBS 中，防止进一步的损伤。