



Annexin V-APC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒

产品简介:

在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞膜中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 是一种分子量为 35-36 kD 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 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将 Annexin V 进行荧光素 APC 标记, 以标记了的 Annexin V 作为荧光探针, 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, 它不能透过完整的细胞膜, 但对凋亡中晚期的细胞和死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此将 Annexin V-APC 与 PI 匹配使用, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

本试剂盒可应用于培养细胞的凋亡检测 (不推荐用于检测组织样本)。

产品组成

组分	R41148-20	R41148-50	R41148-100	储存条件
	20 tests	50 tests	100 tests	
Annexin V-APC	100 μL	250 μL	500 μL	2-8°C, 避光
Propidium Iodide	100 μL	250 μL	500 μL	2-8°C, 避光
Binding Buffer	10 mL	25 mL	50 mL	2-8°C

试剂盒以外自备仪器和试剂

1.5 mL Microtube

PBS

不含 EDTA 的胰酶消化液

流式细胞仪、荧光显微镜、低速离心机、微量移液器

注意事项

1. 微量试剂取用前请离心集液。
2. Annexin V-APC, Propidium Iodide (PI) 避光保存及使用。



3. Propidium Iodide (PI) 有毒, 操作时请戴手套。
4. 本试剂盒适用于检测活细胞, 流式细胞仪检测时, 细胞数量不应低于 1×10^5 个/mL, 不推荐用于检测组织样本。
5. 贴壁细胞, 需用不含 EDTA 的胰酶消化, 如消化不当, 可能引起假阳性, 而用细胞刮刀会造成细胞粘连成团, 影响检测。可将胰酶消化后细胞的保存在含有 2% (w/v) BSA 的 PBS 中, 防止进一步损伤。
6. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭, 请不要固定样品。
7. 因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同、设置参数也不同, 建议每次检测均需使用经凋亡诱导处理的细胞作为对照, 进行荧光补偿的调节。

操作步骤

对于流式操作检测

1. 细胞收集
 - a. 悬浮细胞: $300 \times g$ 离心力, 离心 5 min 收集;
 - b. 贴壁细胞: 贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集 (注: 胰酶消化时间不宜过长, 否则容易引起假阳性);
2. 用 PBS 洗涤细胞 2 次 ($300 \times g$, 离心 5 min) 收集 $1-5 \times 10^5$ 个细胞;
3. 加入 500 μ L 的 Binding Buffer 轻轻吹匀成单细胞悬液;
4. 加入 5 μ L Annexin V-APC 和 5 μ L Propidium Iodide, 轻轻混匀;
5. 室温、避光条件下, 反应 5-10min;
6. 请在 1 h 内, 进行流式细胞仪的观察和检测。
7. 流式细胞仪分析
 - a. 用流式细胞仪检测, Annexin V-APC ($Ex=633$ nm, $Em=660$ nm) 的荧光通道 (FL4) 检测; PI 红色荧光 ($Ex=488$ nm, $Em \geq 630$ nm) 通过 PE 通道 (FL2 或 FL3) 检测。
 - b. 荧光补偿调节: 使用经诱导处理的凋亡细胞, 作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。



对于荧光显微镜检测

1. 选择 24 孔板或 48 孔板进行细胞培养和处理;
2. 染色前, 使用多孔板离心机 $300\times g$, 离心 5 min;
3. 去除细胞培养液, 加入 PBS 洗涤 1 次;
4. 根据样本数量, 计算并配制染色工作液: 在 1.5 mL EP 管中, 加入 500 μL Binding Buffer、5 μL Annexin V-APC 和 5 μL Propidium Iodide, 混匀 (以 500 μL 为例);
5. 将染色工作液加入孔板中 (12 孔板每孔加 500 μL 、24 孔板每孔加 200 μL 、96 孔板每孔加 100 μL), 室温避光孵育 20 min;
6. 即刻在荧光显微镜下观察。

实验范例

1. 流式检测

使用 DDP (20 μM) 诱导人慢性髓系白血病 K562 细胞 48 h, $300\times g$ 离心 5 min, 收集细胞, 参照说明书的操作方法进行检测, 经流式细胞仪检测结果见图 1。

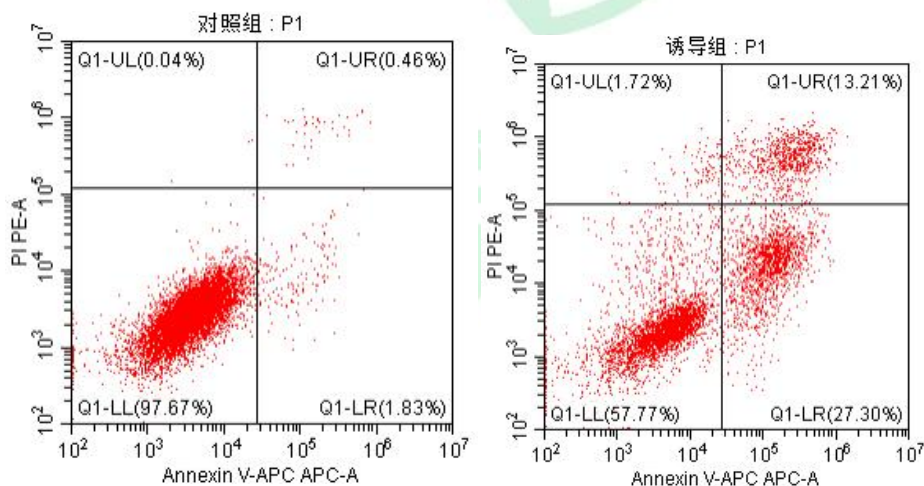


图 1. K562 细胞用本试剂盒染色后流式细胞仪检测细胞凋亡的效果图。K562 细胞未经处理或 DDP (20 μM) 作用 48 h 后, 用本试剂盒染色, 然后用流式细胞仪进行细胞的凋亡检测; (左) 未诱导凋亡的对照组; (右) DDP 诱导组。从图中可以看出, 与对照组相比, K562 细胞经过 DDP (20 μM) 处理后, 其 Annexin V-APC 染色阳性/PI 染色阴性的细胞 (早期凋亡细胞),

明显增加(右下象限), Annexin V-APC 和 PI 染色双阳性的细胞(晚期细胞), 也有所增加(右上象限)。

2. 荧光显微镜检测

使用 DDP (10 μ M) 诱导 HepG2 细胞 48 h, 参照说明书的操作方法进行检测, 经荧光显微镜检测结果见图 2。

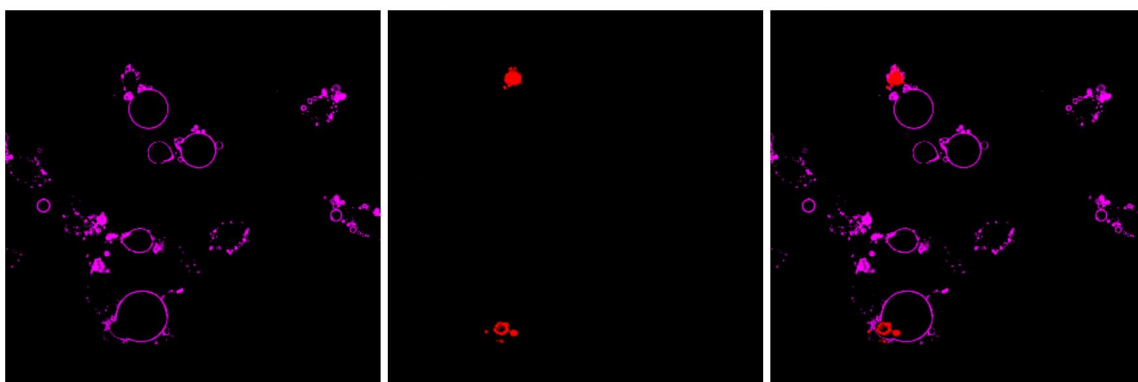


图 2. HepG2 细胞用本试剂盒染色后荧光显微镜检测细胞凋亡的效果图。HepG2 细胞经 DDP (10 μ M) 作用 48 h 后, 用本试剂盒染色, 然后用荧光显微镜检测; (左) 紫红色 APC 通道; (中) 红色 PI 通道; (右) 合并视野。图中紫色荧光为 Annexin V-APC 染色阳性细胞, 红色荧光为 PI 染色阳性细胞。仅被紫色荧光染色的为早期凋亡细胞, 被紫色和红色荧光双染的是晚期凋亡细胞。