



AnnexinV-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒

产品组成	R32128 50T	R32128 100T
Annexin V-FITC	250μL	500μL
Propidium iodide	500μL	1mL
Binding Buffer(10×)	25mL	50mL
说明书	1份	1份

产品简介

本试剂盒用于检测细胞凋亡早期的发生, 其中 Annexin V 为胞内蛋白膜联蛋白家族成员, 以钙离子依赖的方式选择性与磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合。

PS 正常分布在细胞膜内侧, 即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期, 不同类型的细胞都会把 PS 外翻到细胞膜外侧。用带有 FITC 标记的 Annexin V, 即 Annexin V-FITC, 就可以通过流式细胞仪或荧光显微镜检测到 PS 外翻这一细胞凋亡的重要特征。

碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂, 在嵌入 DNA 后释放红色荧光。PI 不能穿透完整的细胞膜, 但可以穿透坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞。因此, 将 Annexin V 与 PI 联合使用时, PI 被排除在活细胞 (Annexin V-/PI-) 和早期凋亡细胞 (Annexin V+/PI-) 外, 而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 FITC 和 PI 结合染色呈现双阳性 (Annexin V+/PI+)。FITC 最大吸收波长为 490nm, 发射波长为 525nm, PI-DNA 复合物的最大吸收和发射波长分别为 535nm 和 615nm。

使用方法

(一) 样品染色

1. 将 Binding Buffer (10×) 稀释成 1×Binding Buffer 工作液备用 (1mL Binding Buffer (10×) 需加入 9mL 无菌去离子水)。

2. 对于悬浮细胞, 500-1000g 离心 5min 收集细胞。



对于贴壁细胞, 要用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 胰酶消化时间不宜过长或过短, 最好是在轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时, 加入细胞培养液, 将细胞轻轻吹打下来, 转移到离心管内, 500-1000g 离心 5min 收集细胞。

3. 收集细胞后, 加入预冷 PBS 溶液轻摇或用移液器轻柔吹打洗涤, 离心收集细胞, 共洗涤两次。

4. 在细胞沉淀中加入 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 工作液, 重悬细胞, 使细胞浓度达到 $1 \times 10^6 \text{ cell/mL}$ 。

5. 吸取 100 μL 细胞悬液 (细胞总数为 $1 \times 10^5 \text{ cell}$) 至一新管中, 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5- 10 μL PI, 轻轻混匀, 室温避光孵育 15min。

(二) 样品检测

1. 流式细胞仪检测:

染色孵育后, 每管加入 400 μL $1 \times \text{Binding Buffer}$ 工作液, 混匀后使用流式细胞仪检测 (1 小时内检测)。

建议设置正常细胞、PI 单染和 Annexin V-FITC 单染 3 个对照组, 正常细胞组可作为荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。若十字门的位置不易设定, 可采用经凋亡诱导的细胞进行设定。结果可用 CellQuest 等软件进行分析, 绘制双色散点图 (two-color dot plot), FITC 为横坐标, PI 为纵坐标。Annexin V-FITC 和 PI 联合使用时, 活细胞仅有很低强度的背景荧光, 早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光, 晚期凋亡细胞有绿色和红色双重荧光。

2. 荧光显微镜检测:

染色孵育后, 显微镜下观察。使用荧光显微镜上的蓝光和绿光通道分别观察 FITC 和 PI。被 Annexin V-FITC 结合的细胞显示浆膜上有绿色光环。丧失细胞膜完整性的细胞, 细胞核显示红色, 膜上有绿色光环。

保存条件

2~8°C 保存, 12 个月有效。Annexin V-FITC 不可冷冻。

注意事项

1. 可立式离心管内试剂在开盖前请短暂离心, 将盖内壁上的液体甩至管底, 避免开盖时液体洒落。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

2. Annexin V-FITC 和碘化丙啶 (PI) 是光敏物质, 在保存与操作时请注意光。
3. 在细胞洗涤的最后一步, 请尽量将上清弃净, 以免 PBS 残留影响实验结果。
4. 为获得准确试验结果, 建议样品在染色后 1 小时内进行分析。
5. 为了您的安全和健康, 请穿戴实验防护服、手套、口罩等必要的防护装备。



源叶