

Annexin V-Alexa Fluor 488/PI Kit 凋亡检测试剂盒

货号: CA1040

规格: 20T/50T/100T

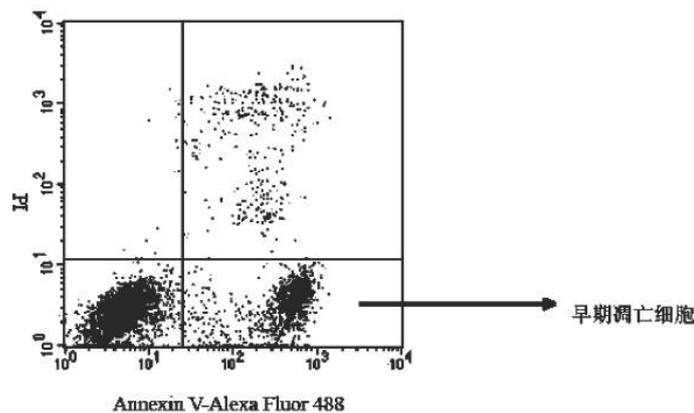
保存: 2-8°C 避光保存, 勿冰冻。

产品组分:

组分	CA1040-20	CA1040-50	CA1040-100
10× Binding Buffer	2ml	5ml	10ml
Propidium Iodide	0.1ml	0.25ml	0.5ml
rh Annexin V/Alexa Fluor 488	0.1ml	0.25ml	0.5ml

产品简介:

细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面, 这些细胞膜表面的改变之一是磷脂酰丝氨酸(PS)从细胞膜内转移到细胞膜外, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。PS 是一种带负电荷的磷脂, 正常主要存在于细胞膜的内面, 在细胞发生凋亡时细胞膜上的这种磷脂分布的不对称性被破坏而使 PS 暴露在细胞膜外。Annexin V 具有易于结合到磷脂类如 PS 的特性, 对 PS 有高度的亲和性。因此, 该蛋白可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS。PS 转移到细胞膜外不是凋亡所独特的, 也可发生在细胞坏死中。两种细胞死亡方式间的差别是在凋亡的初始阶段细胞膜是完好的, 而细胞坏死在其早期阶段细胞膜的完整性就破坏了。因此, 可以采用 Annexin V 与PI 双染的方法, 通过流式检测细胞早期凋亡。



Jurkat 细胞用紫外诱导凋亡后用 Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 双染流式分析图谱

操作步骤(仅供参考):

1、细胞样品的准备:

①对于贴壁细胞: 小心收集细胞培养液到一离心管内备用。用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时, 加入前面收集的细胞培养液, 吹打下所有的贴壁细胞,

并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。1000rpm 左右离心 5min，沉淀细胞。对于特定的细胞，如果细胞无法完全离心至离心管底，可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清，可以残留约 50 μ l 左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1ml 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清；

②对于悬浮细胞：1000rpm 左右离心 5min，沉淀细胞。对于特定的细胞，如果细胞无法完全离心至离心管底，可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清，可以残留约 50 μ l 左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1ml 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清；

2、用去离子水按 1:9 稀释结合缓冲液(2ml 10x 结合缓冲液+18ml 去离子水)；

3、用 1 \times 结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为 $1-5 \times 10^6$ /ml；

4、取 100 μ l 的细胞悬液于 5ml 流式管中，加入 5 μ l Annexin V/Alexa Fluor 488 混匀后于室温避光孵育 5 分钟；

5、加入 5 μ l 20ug/ml 的碘化丙锭溶液(PI)，并加 400 μ l PBS，立刻进行流式检测。

实验设计：

1、空白管：阴性对照组细胞，不加 Annexin V/Alexa Fluor 488，碘化丙锭溶液(PI)。用于调节电压；

2、单染管：阳性对照组细胞，只加 Annexin V/Alexa Fluor 488。用于调节补偿；

3、检测管：处理的细胞，加 Annexin V/Alexa Fluor 488，碘化丙锭溶液(PI)。用空白管和单染管调整好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

注意事项：

1、Annexin V 是与磷脂酰丝氨酸(PS)亲和，而 PS 在不同种属间没差异。在正常细胞中，PS 只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，PS 由脂膜内侧翻向外侧；

2、低浓度胰酶消化，轻柔吹打贴壁细胞 2~3 次，离心机 4 $^{\circ}$ C 1000rpm 5min 离心，处理得当的话，胰酶造成损伤可以控制在 5%以内，有对照组的情况下对实验结果不会造成明显影响。

3、先加 PI 不仅染色是否每组都均匀充分很难判断，而且 PI 本身对细胞也是有毒性的，对实验结果影响会比胰酶大，不建议这样做；

4、Annexin V 是 Ca 依赖的蛋白，所以不能加入 EDTA，防止 EDTA 螯合了 Ca 离子从而影响 Annexin V，进而影响结果。

5、用流式检测凋亡时，PI 受时间的影响很大，因标记了 PI 后会加大细胞毒性，随着时间延长会导致 PI 的染色增加，特别是检测早期凋亡时，如果时间延长除了会导致在流式细胞仪上的细胞分群差距加大外，误差会明显加大。一般 PI 加上后立刻上机，然后在一个小时內检测完成。两种方法都可以，但是按照我们操作步骤造成的误差会更小。

相关产品：

CA1050 AnnexinV-Alexa Fluor647/PI 凋亡检测试剂盒

CA1030 Annexin V- PE/7AAD 凋亡检测试剂盒