

Superbrilliant® Annexin V/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒

Superbrilliant® Annexin V/PI Double Staining Cell Apoptosis Detection Kit

Cat.No.: ZS-C31001

组分

货号	组 分	ZS-C-31001S (50T)	ZS-C-31001M (100T)	ZS-C-31001L (500T)
103021	Annexin V-FITC	250 µl	500 µl	2.5 ml
103022	PI Staining Solution	250 µl	500 µl	2.5 ml
102017	10× Annexin V Binding Buffer	15 ml	15 ml	60 ml

储存： 2~8℃，有效期 1 年。

简介: 细胞凋亡 (Apoptosis) 是由基因控制的细胞自主的有序性死亡, 又称为程序性细胞死亡 (Programmed Cell Death), 在机体发育、组织稳定等方面起着十分重要的作用。Annexin V/PI 双染法是根据凋亡细胞出现细胞膜的不对称性丧失, 即磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidyl serine, PS) 由膜内向膜外翻转原理所建立。Annexin V 是一种分子量为 35~36kD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, 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。能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸 PS 高亲和力特异性结合。Annexin V 是检测早期细胞凋亡的最灵敏指标之一, 以标记了 FITC 的 Annexin V 作为荧光探针, 利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。Propidium iodide (PI) 是一种核酸染料, 它不能透过完整的细胞膜, 但凋亡中晚期和死细胞由于细胞膜破裂, 因此 PI 能够将细胞核染红。将 AnnexinV 与 PI 匹配使用, 若横坐标表示 Annexin V 信号, 纵坐标表示 PI 信号, 则左下象限 (Annexin V-/PI-) 代表活细胞; 右下象限 (Annexin V+ /PI-) 代表早期凋亡细胞; 右上象限 (Annexin V+ /PI+) 代表凋亡晚期细胞和坏死细胞; 左上象限 (Annexin V-/PI+) 被认为是许可范围内的检测误差。

本试剂盒使用改进型的高纯度 FITC 染料, 其在红色通道 (690nm) 无发射光, 因此极大的减少了对红色通道的干扰。使用该试剂盒进行细胞凋亡检测时荧光相互干扰更小、检测更准确。

注意事项

1. 整个操作过程动作要尽量轻柔，勿用力吹打细胞。
2. 反应完毕后请尽快检测，反应 1 小时后荧光强度就开始衰变。
3. Annexin V-FITC 和 Propidium iodide 是光敏物质，在操作时请注意避光。
4. 试验操作过程中佩戴手套等防护用品。
5. 试验开始前将一定量的 10× Annexin V Binding Buffer 用超纯水（1：9）稀释至 1×备用。
6. 注意避免反复冻融
7. 如果有细菌或真菌污染，会严重影响检测效果。
8. 如果细胞收集过程中使用了胰酶，需注意设法去除残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-FITC，导致染色失败。
9. 用于流式细胞仪检测时，如果发现 Annexin V-FITC 单独染色时出现了过多的 PI 假阳性细胞，并且通过调整相关设置和参数也无法改善，可以用 PBS 将 Annexin V-FITC 稀释 3-10 倍后再进行检测，这样通常可以有效减少假阳性的坏死细胞。

操作步骤

1. 贴壁细胞：用胰酶消化至单细胞悬液； 悬浮细胞：可直接使用。
2. 1000 rpm（400g），离心 5 min，弃上清。
3. 加入 1 ml PBS，轻轻吹打使细胞悬浮，1000rpm，离心 5 min，弃上清。
4. 再重复步骤 3 一次，尽可能吸除多余的 PBS 溶液；
5. 加入 1× Annexin V Binding Buffer 重悬细胞，使细胞密度为 $0.2 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml。

注意: a. 必须使用 1× Annexin V Binding Buffer 重悬细胞 (不可使用 PBS 重悬, 否则会导致 Annexin V 无法结合 PS 位点);

b. 将细胞悬液用 200 目筛网过滤一次, 再进行下述操作将有助于获得最佳试验结果。

6. 取 100 μ l 上述细胞重悬液, 加入 5 μ l Annexin V-FITC、5 μ l PI Staining Solution 混合均匀, 室温避光放置 15 min。

7. 反应结束后加 400 μ l Binding Buffer 轻轻混匀在 1 小时内上流式细胞仪检测。

注意: a. 流式细胞仪要求配备 488 nm 激发光源; FITC 使用绿色通道检测 (525 nm); PI 推荐使用红色通道检测 (690 nm), PI 也可使用黄色通道检测 (580 nm), 但黄色通道必须进行荧光补偿操作。

b. 本试剂采用高纯度改进型 FITC 染料, 其无法在红色通道检测, 因此采用绿色通道和红色通道进行检测时, 通常无需荧光补偿操作。

8. 若用荧光显微镜检测, 将细胞混合液离心, 取细胞沉淀涂片, 再进行观察。

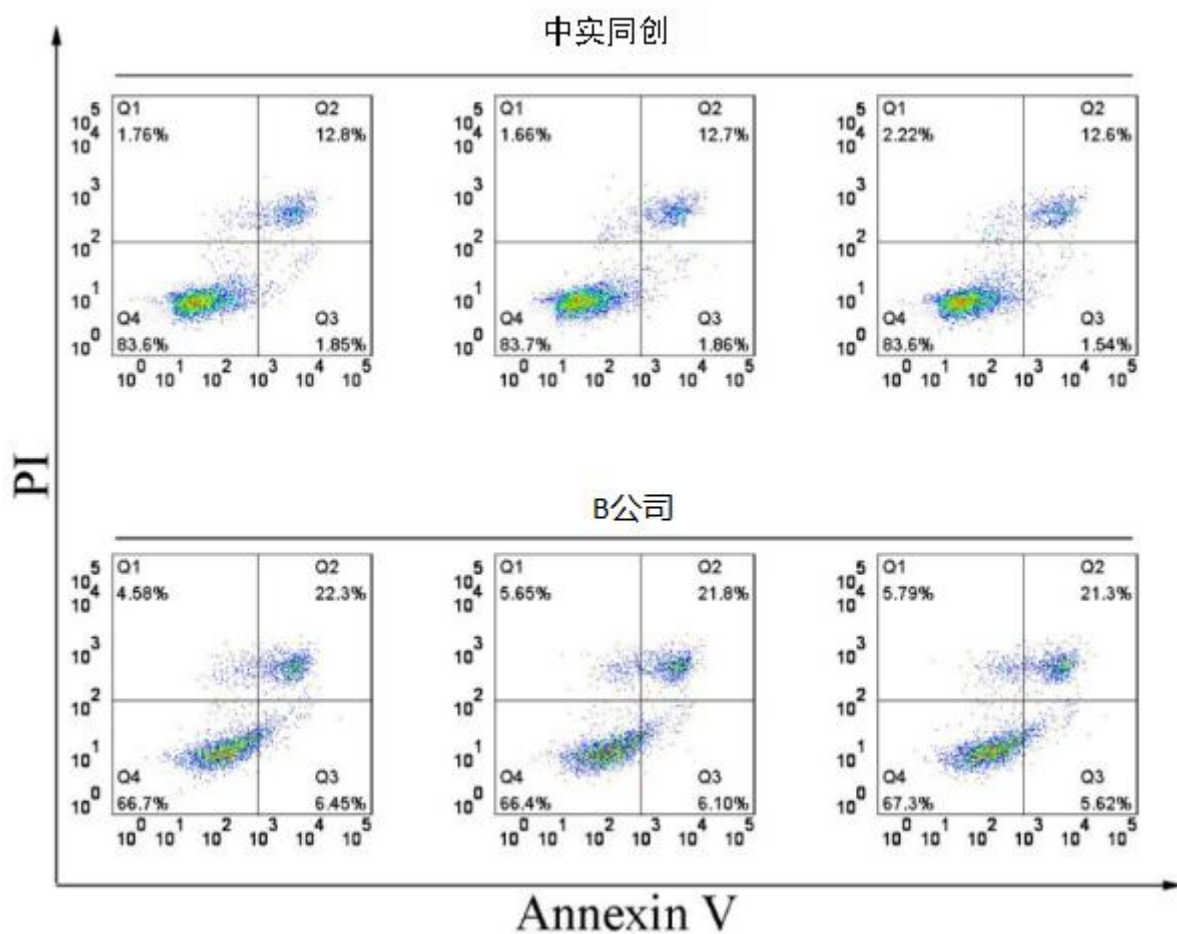


Fig 1.处理好的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞用 Annexin V 和 PI (各 5 μ l)在室温下避光染色 15 min, 再进行 BD 流式细胞分析, 通过 Flow Jo 分析数据。