

细胞凋亡检测试剂盒(FITC/PI 双染法)

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 35~36kD 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 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（FITC）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。

本试剂盒还提供了碘化丙啶染色液，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，但凋亡中晚期的细胞和死细胞由于细胞膜通透性的增加，PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此将 Annexin V 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。

主要组分：

名称	规格
Annexin V-FITC	100 ul
5×Binding buffer	1.5ml*2
Propidium Iodide	200ul

储存条件：

各组分应在 2-8℃条件下避光保存，24 个月。

使用方法：

1. 悬浮细胞离心（2000rpm 离心 5min）收集；贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集（注：胰酶消化时间不易过长，否则容易引起假阳性）；
2. 用 PBS 洗涤细胞二次（2000rpm 离心 5min）收集 $1-5 \times 10^5$ 细胞；
3. 加入 500μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞；
4. 加入 5μL Annexin V-FITC 混匀后，室温避光，反应 15-30min；
5. 用 PBS 洗涤细胞一次（2000rpm 离心 5min），500μL PBS 重悬细胞；
6. 加入 10 μL Propidium Iodide；

7. 室温，避光，孵育 5min，上机检测。

8. 注：请在 1 hour 内，进行下述荧光显微镜或流式细胞仪的观察和检测。

a. 荧光显微镜观察

1) 滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞；

2) 对于贴壁细胞来说，也可直接用盖玻片来培养细胞并诱导细胞凋亡；

1 将细胞于盖玻片上生长，用适当的凋亡诱导剂诱导细胞凋亡，并设立阴性对照组；

2 用 PBS 洗涤细胞两次；

3 在 500 μ L 的 Binding Buffer 中加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L Propidium Iodide 混匀；

4 将上述溶液滴加于盖玻片表面，使盖玻片表面均匀覆盖；

5 避光、室温反应 5 min。

3) 将盖玻片倒置于载玻片上，于荧光显微镜下滤光片 (FITC) 观察，Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色。

b. 流式细胞仪分析

1) 用流式细胞仪检测，激发波长 Ex=488 nm; 发射波长 Em=525nm。Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道 (FL1) 检测。

注意事项：

1. 微量试剂取用前请离心集液。

2. Annexin V-FITC 避光保存及使用。

3. 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 ，，不推荐用于检测组织样本。

4. 推荐使用悬浮培养细胞。如果是贴壁细胞，需用不含 EDTA 的胰酶消化，如消化不当，可能引起假阳性，而用细胞刮子会造成细胞粘连成团，而影响检测。可将胰酶消化后细胞的保存在含 2%BSA 的 PBS 中，防止进一步的损伤。

5. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭，请不要固定样品。

6. 因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同，因而流式检测的荧光补偿也不同，因此建议每次检测均需使用未经凋亡诱导处理的细胞作为对照，进行荧光补偿的调节。

***本试剂仅供实验室研究使用**