

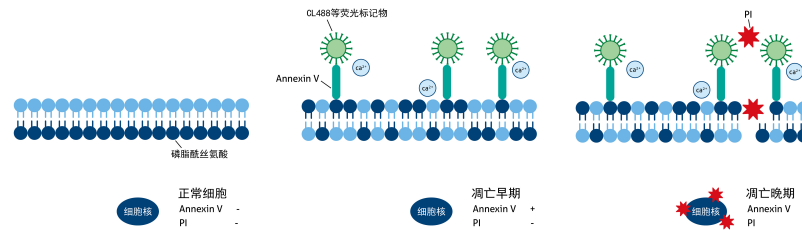
Catalog Number: PF00005

产品介绍:

CoraLite®488-Annexin V 和 PI 细胞凋亡检测试剂盒提供了一种快速简便的方法，通过标记早期凋亡细胞（绿色）和晚期凋亡细胞或坏死细胞（红色），用于检测细胞凋亡水平。产品可以使用流式细胞仪或其它荧光检测设备进行检测。

Annexin V 可以选择性结合磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, 简称 PS)。在细胞发生早期凋亡时，PS 会外翻到细胞表面，即细胞膜外侧。用绿色荧光探针 CL488 标记的 Annexin V, 即 CL488-Annexin V, 可以结合外翻的磷脂酰丝氨酸, 从而检测凋亡早期的细胞。CL488 染料与荧光素/FITC 相比, 荧光亮度更高, 且不受环境中 pH 的影响, 具有良好的光稳定性。

碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种 DNA 结合染料, 它可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞的细胞核。PI 可以由 488,532 或 546 nm 的激光激发, 呈现红色荧光。



Annexin V/PI 检测细胞凋亡原理图

产品内容:

组分	50T	100T
A. 1×Annexin V 结合缓冲液	50 mL	50 mL x 2
B. CL488-Annexin V	250 μL	500 μL
C. PI	500 μL	1 ml

产品规格:

50T/100T

光谱特性:

CL488-Annexin V: Ex/Em=490/515 nm
 PI: Ex/Em = 535/617 nm (with DNA)

储存条件:

4°C避光冷藏, 请勿冻存。本产品在推荐条件下至少可以储存6个月。

使用方法:

下列实验方案以利用星形孢菌素诱导 Jurkat 细胞凋亡为例, 如果使用其他诱导剂和其他类型的细胞, 实验条件需要略作调整。

一、流式细胞检测

- 根据实验要求诱导细胞凋亡。检测样品中应包含未经处理的细胞样品, 作为阴性对照。此外, 设定一组样品做单染, 用于调节补偿。
- 收集细胞。悬浮细胞: 300 g, 4°C离心 5 min 收集细胞; 贴壁细胞: 用不含 EDTA 的胰酶消化后 300 g, 4°C离心 5 min 收集细胞, 胰酶消化时间不宜过长, 以防引起假阳性。
注: 用胰蛋白酶消化后, 将细胞在最佳细胞培养条件和培养基中恢复约 30 min, 然后再染色。胰蛋白酶消化会暂时破坏质膜, 允许 Annexin V 结合磷脂酰丝氨酸在细胞膜的细胞质表面上, 从而导致假阳性染色。
- 用预冷的 PBS 洗涤细胞两次, 每次均在 300 g, 4°C 下离心 5 min, 收集 $1-5 \times 10^5$ 个细胞并用 100 μL 1×结合缓冲液重悬细胞。
- 每管加入 4-5 μL 的 CL488-Annexin V 和 5 μL 的 PI 工作液。
注: 我们推荐准备两管额外的流式管, 每管中只加入一种单染染料 (CL488-Annexin V 和 PI), 用于流式单染的补偿调节。
- 室温避光孵育 10-15 min, 为避免细胞凋亡进程, 孵育过程可在冰上操作。
- 每管加入 400 μL 的 PBS 或 1×结合缓冲液, 尽快通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。CL488-Annexin V 由 488 nm 激光激发, 检测荧光发射光谱在 530 nm 处 (FITC 通道), PI 通道发射光谱约在 617 nm 处。
注: PBS 或 1×结合缓冲液的选择根据不同凋亡处理以及不同细胞具体选择。

For technical support and original validation data for this product please contact:

T: 027-87531629 E: Proteintech-CN@ptglab.com W: ptgcn.com

This product is exclusively available under Proteintech Group brand and is not available to purchase from any other manufacturer.

二、荧光显微镜检测

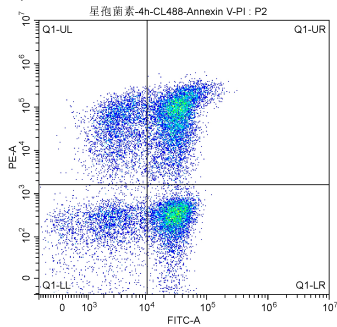
对于悬浮细胞，可参照流式细胞检测的方法进行具体操作。

1. 在盖玻片或载玻片小室中接种细胞。
2. 根据实验要求诱导细胞凋亡。检测样品中应包含未经处理的细胞样品，作为阴性对照。
3. 用PBS洗涤细胞。
注：细胞收集后如果不用PBS清洗，可以用含血清的培养基直接替代Annexin V结合缓冲液，但是Annexin V的使用浓度需要重新优化。
4. 每100 μL的1× Annexin V结合缓冲液中加入5-25 μL的CL488-Annexin V和5 μL的PI。
注：最佳使用浓度由具体实验要求确定。
5. 向培养板中加入足量的染液以覆盖全部细胞，室温避光孵育15-30 min。为避免细胞凋亡进程，孵育过程可在冰上操作，但孵育时间至少延长至30 min。
6. 用1×结合缓冲液清洗细胞。
7. 将孵育有细胞的盖玻片置于载玻片上，载玻片可提前加一滴1×结合缓冲液；对于培养在小室内的细胞，可直接加入足量的1×结合缓冲液覆盖细胞。
8. 使用合适的滤光片观察细胞。CL488-Annexin V可用FITC适用的滤光片，PI可用Cy3或者Texas适用的滤光片。

流式细胞检测结果:

在SSC/FSC图中分析细胞群体:

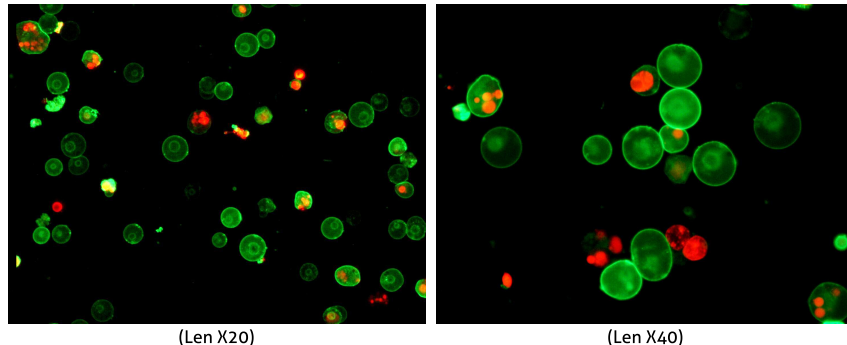
X轴选择FITC-A,用来表示CL488-AnnexinV。Y轴选择PE-A,用来表示PI。如下图所示:



左图中各个区域的含义:

- Q1-UL:** (CL488-AnnexinV)-/PI+, 此区域的细胞为坏死细胞。也可能有少数的晚期凋亡细胞在其中，甚至机械损伤的细胞也包含其中。
Q1-UR: (CL488-AnnexinV)+/PI+, 此区域的细胞为晚期凋亡细胞。
Q1-LR: (CL488-AnnexinV)+/PI-, 此区域的细胞为早期凋亡细胞。
Q1-LL: (CL488-AnnexinV)-/PI-, 此区域的细胞为活细胞。
通常统计细胞凋亡率时采用Q1-UR+Q1-LR, 晚期凋亡+早期凋亡群(即所有Annexin V阳性群)。

免疫荧光检测结果:



Green: Staining with CL488-Annexin V for Apoptotic cells or Early apoptotic cells;
Red: Staining with PI for Dead cells;
Yellow: double staining with CL488-Annexin V and PI for Necrotic cell or Late apoptotic cells.

注意事项:

1. 荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 细胞在染色后须尽快完成检测，通常宜在1h之内完成检测。

For technical support and original validation data for this product please contact:

T: 027-87531629 E: Proteintech-CN@ptglab.com W: ptgcn.com

This product is exclusively available under Proteintech Group brand and is not available to purchase from any other manufacturer.