

Annexin V-EGFP 细胞死亡检测试剂盒 (Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit) Cell Biology

产品编号: CTK008

产品简介: Annexin V-EGFP/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit) 是用EGFP 融合的 Annexin V 作为探针, 来检测细胞凋亡。可用荧光显微镜、流式细胞仪或其它荧光检测设备进行检测。检测原理为: 在正常的活细胞中, 磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 位于细胞膜的内侧, 但在早期凋亡的细胞中, PS 从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面, 暴露在细胞外环境中。Annexin-V (膜联蛋白-V) 是一种分子量为35-36KD 的钙离子依赖性磷脂结合蛋白, 能与PS 高亲和力结合。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。

碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 用来区分存活的早期细胞和坏死或晚期凋亡细胞。PI 是一种核酸染料, 它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜, 但可以透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜而使细胞核染红。因此, 将Annexin V 与PI 联合使用时, PI 则被排除在活细胞 (Annexin V-/PI-) 和早期凋亡细胞 (Annexin V+/PI-) 之外, 而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被EGFP 和PI 结合染色呈现双阳性 (Annexin V+/PI+)。

包装规格: 20/50/100 tests

储存条件: 本试剂盒中所有组分均在4℃保存, Annexin V-EGFP、PI 需避光保存。长期不用可将Annexin V-EGFP 放到-20℃保存。

产品组分:

结合缓冲液 **1X Binding Buffer**

体积: 10/25/50 ml

碘化丙啶溶液 (**Propidium Iodide, PI**)

体积: 0.1/0.25/0.5 ml

浓度: 25 ug/ml

重组 **Annexin V-EGFP**

包装规格: 0.1/0.25/0.5 ml, 可用于20/50/100 次标准检测

保存方法: 于 50 mM Tris (pH7.4), 100 mM NaCl, 1% BSA, 0.02% NaN₃, pH7.4 溶液中保存

生物活性: Annexin V 可结合于磷脂酰丝氨酸并表现出抗磷脂酶活性

操作流程:

样品染色

- 悬浮细胞: 300g, 4℃离心3 min 收集细胞。
- 贴壁细胞: 用不含EDTA 的胰酶消化后, 300g, 4℃离心3 min 收集细胞。胰酶消化时间不宜过长,

FOR RESEARCH USE ONLY, NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC PROCEDURES

M&C Gene Technology • Phone: (010)8205-7786 • (010)8693-7385 • Fax: (010)8205-9875

E-mail: order@macgene.com • Tech Support: support@macgene.com • URL: <http://www.macgene.com>

以防引起假阳性。

- 用预冷的PBS 洗涤细胞2 次，每次均需300g，4℃ 离心3 min。收集1~5×10⁵ 细胞。
- 加入100 μl 1×Binding Buffer 重悬细胞。
- 加入5 μl Annexin V-EGFP 和5 μl PI，轻轻混匀。
- 避光、室温反应10 min。
- 加入400 μl 1×Binding Buffer，混匀，样品在1 小时内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

样品分析

A. 流式细胞仪分析

EGFP 最大激发波长为488 nm，最大发射波长为507 nm；PI-DNA 复合物的最大激发波长为535 nm，最大发射波长为615 nm。用CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图（two-color dot plot），EGFP 为横坐标，PI 为纵坐标。每个样采集10,000 events。典型的实验中，细胞可以分成三个亚群，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荧光双重染色。

B. 荧光显微镜分析

- 滴一滴用 Annexin V-EGFP/PI 双染的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。

注：对于贴壁细胞，可直接用盖玻片培养细胞并诱导细胞凋亡。

- 在荧光显微镜下用双色滤光片观察。Annexin V-EGFP 荧光信号呈绿色，PI 荧光信号呈红色。

注意事项：

- 由于细胞凋亡是一个快速的过程，建议样品在染色后1 小时之内进行分析。
- 对于贴壁细胞，消化是一个关键步骤。贴壁细胞诱导细胞凋亡时如有漂浮细胞，需收集漂浮细胞和贴壁细胞后合并染色。处理贴壁细胞时要小心操作，尽量避免人为的损伤细胞。胰酶消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，PI 摄入过多；消化时间过长，细胞膜同样易造成损伤，甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与Annexin V-EGFP 的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后，轻摇时胰酶与细胞充分接触，然后倒掉大部分胰酶，利用剩余的少量胰酶再消化一段时间，待细胞间空隙增大，瓶底呈花斑状即可终止。在消化液中尽量不用EDTA，EDTA 会影响Annexin V 与PS 的结合。
- 实验中如需要固定细胞，比如在检测凋亡的同时检测细胞周期，只能选用Annexin V-FITC，而不能选用Annexin V-EGFP，因为在固定过程中EGFP 会变性导致丧失激发荧光的能力。固定前需要先将细胞与Annexin V-FITC 进行孵育，并用binding buffer 洗掉未结合的Annexin V-FITC。因为固定过程中细胞通透性增加会产生细胞碎片，可以和Annexin V 结合，对结果产生干扰。
- 如果样品来源于血液，请务必除去血液中的血小板。因为血小板含有PS，能与Annexin V 结合，从而干扰实验结果。可以使用含有EDTA 的缓冲剂并在200 g 离心洗去血小板。
- 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。
- Annexin V-EGFP 和 PI 是光敏物质，在操作时请注意避光。

FOR RESEARCH USE ONLY, NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC PROCEDURES



M&C Gene Technology • Phone: (010)8205-7786 • (010)8693-7385 • Fax: (010)8205-9875

E-mail: order@macgene.com • Tech Support: support@macgene.com • URL: <http://www.macgene.com>