YF®647A-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒

货　　号：AF2021-100T

储存条件： 4℃避光冷藏，请勿冻存。

产品组分

组分	AF2021-100T
1×Annexin V 结合缓冲液	50 mL×2
YF®647A-Annexin V	500 μL
PI	1 mL

光谱特性

YF®647A-Annexin V：Ex/Em = 650/665 nm

PI：Ex/Em = 535/617 nm (with DNA)

产品简介

YF®647A-Annexin V 和 PI 凋亡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（远红）和坏死细胞（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。

YF®647A-Annexin V 可以标记凋亡细胞。Annexin V 选择性结合磷酯酰丝氨酸（phosphatidylserine，简称 PS）。在细胞发生早期凋亡时，磷酯酰丝氨酸会外翻到细胞表面，即细胞膜外侧。用远红荧光探针 YF®647A 标记的 Annexin V，即 YF®647A-Annexin V，可以结合外翻的磷酯酰丝氨酸，从而检测细胞凋亡的重要特征。 YF®647A 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。

使用方法

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

1．流式细胞检测

（1）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，作阴性对照；一组样品做单染，用于调节补偿。

（2）收集细胞。

悬浮细胞：300 g，4℃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℃ 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：细胞用胰蛋白酶消化后，在最佳培养条件和培养基中恢复约 30 min 后染色，避免假阳性。

（3）用预冷的 PBS 洗涤细胞两次，300 g，4℃下离心 5 min，收集 1-5×10^5 个细胞并用 100 μL 1×结合缓冲液重悬细胞。

（4）每管加入 4-5 μL 的 YF®647A -Annexin V 和 5 μL 的 PI 工作液。

注：推荐准备两管额外的细胞，每管只加入一种单染染料 （YF®647A-Annexin V 和 PI），用于流式单染的补偿调节。

（5）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。

（6）每管加入 400 μL 的 PBS 或 1×结合缓冲液重悬细胞（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），尽快通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。 YF®647A-Annexin V 可以由 647 nm 激光激发，检测荧光发射光谱约在 647 nm 处（APC 通道），PI 发射光谱约在 617 nm 处。

2．荧光显微镜检测

（1）将细胞接种在盖玻片或载玻片小室中。

（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：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。建议梯度测试。

（4）每 100 μL 的 Annexin V 结合缓冲液中加入 5-25 μL 的 YF®647A-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。为降低细胞凋亡进程，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）使用合适的滤光片在荧光显微镜下观察细胞。 YF®647A-Annexin V 可用 APC 适用的滤光片，PI 可用 Cy3 或者 Texas 滤光片。

注意事项

1. 荧光染料均存在淬灭问题，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. 本产品仅用于科研 。