

YF®647A-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒

货号: AF2021-100T

储存条件: 4°C避光冷藏, 请勿冻存。

产品组分

| | |
|-------------------|-------------|
| 组分 | AF2021-100T |
| 4×Annexin V 结合缓冲液 | 20ml |
| 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他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**磷脂酰丝氨酸** (phosphatidylserine, 简称 PS)。在细胞发生早期凋亡时, **磷脂酰丝氨酸**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**磷脂酰丝氨酸**, 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, 做阴性对照; 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°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: 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°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。

注: 用去离子水按 1:3 稀释 Binding Buffer (4ml Binding Buffer+12ml 去离子水)

- (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 \times 结合缓冲液重悬细胞（PBS 或 1 \times 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。为减缓细胞凋亡进程，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 \times 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 \times 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 \times 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。

