

产品说明书

产品名称: YF[®]647A-Annexin V 和 PI 细胞凋亡检测试剂盒

产品货号: BN16026

产品规格: 50T, 100T

产品内容:

组分	50T	100T
A. 1×Annexin V 结合缓冲液	50 mL	50 mL×2
B. YF647A-Annexin V	250 μL	500 μL
C. PI	500 μL	1 mL

储存条件

4℃避光冷藏, 请勿冻存。本产品推荐条件下可以储存 6 个月。

光谱特性

YF647A-Annexin V: Abs/Em = 650/665 nm

PI: Abs/Em = 535/617 nm (with DNA)

产品介绍

YF647A-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。

YF647A -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, PS 会外翻到细胞表面, 即细胞膜外侧。用远红色荧光探针 YF647A 标记的 Annexin V, 即 YF647A -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。我们公司的 YF647A 染料与普通荧光素相比, 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℃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: 用胰蛋白酶消化然后使细胞在最佳细胞培养条件和培养基中恢复约30分钟, 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℃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。

4. 每管加入 4-5 μL 的 YF647A -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（YF647A-Annexin V 和 PI 各一管），用于流式的补偿调节。

5. 室温避光孵育 10-15 min，为避免影响细胞凋亡进程，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，尽快通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。YF647A-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。

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 Annexin V 结合缓冲液中加入 5-25 μL 的 YF647A -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。为避免影响细胞凋亡进程，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。YF647A -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：

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。