

产品说明书

产品名称: **Annexin V-PE and RedNucleus II Apoptosis Kit**

产品货号: BN16079

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. Annexin V-PE	250 μL	500 μL
C. RedNucleus II	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。

Annexin V-PE 储存于 50mM Tris, 100mM NaCl, 1% BSA, 0.02% Na₃N, pH7.4 的溶液中。

光谱特性

Annexin V-PE: Ex/Em = 488/578 nm

RedNucleus II : Ex/Em=635/695nm

产品介绍

Annexin V 是一类广泛分布于真核细胞胞浆的钙离子依赖性的磷脂结合蛋白。Annexin V 则选择性的结合磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS), PS 在细胞正常状态下是分布于细胞磷脂层内侧, 即靠近细胞质, 当细胞处于早期凋亡阶段, PS 会从细胞内侧翻转至细胞外侧, 此时 Annexin V 可以与 PS 结合, 被红色荧光染料 PE 标记的 Annexin V 作为探针则会在一定波长激发的情况下检测出处于早期凋亡状态的细胞。对于坏死细胞, 由于细胞完整性已经被破坏, Annexin V-PE 则可以进入胞浆与处于磷脂层内侧的 PS 结合, 从而使坏死细胞呈现红色荧光。

本试剂盒中提供的 RedNucleus II 是一种远红光染料,

属于葱醌类化合物, 不能透过活细胞和早期凋亡细胞完整的细胞膜, 是非渗透性的, 但是可以快速染色死亡和透化细胞中的细胞核/ dsDNA。RedNucleus II 是一种理想的碘化丙啶 (PI) 和 7-AAD 的替代物, 与 PE 联用, 无需补偿调节, 具有更好的光谱特性: 不受紫外线的激发, 也不与 PE/PE 同系物重叠发射, 故可以和 FITC, PE 及紫色荧光染料结合用于多色分析。与 Annexin V-PE 联用时, RedNucleus II 被排除在活细胞和早期凋亡细胞外, 而晚期凋亡细胞和死细胞则同时被 Annexin V-PE 和 RedNucleus II 结合染色呈现双阳性。

Annexin V-PE / RedNucleus II 细胞凋亡检测试剂盒可用流式细胞仪及或其他荧光检测设备进行检测。

使用方法

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, 作为阴性对照。

2. 沉淀细胞

悬浮细胞: 1000 rpm, 离心 5 min。

贴壁细胞: 用不含 EDTA 的胰酶消化后 1000 rpm, 离心 5 min。胰酶消化时间不宜过长, 以防引起假阳性。对于特定的细胞, 如果细胞无法完全离心至管底, 可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清, 可以残留约 50 μL 左右的培养液, 以避免吸走细胞。

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。

3. 加入约 1mL 4℃ 预冷的 PBS, 重悬细胞, 1000rpm, 离心 5min。
4. 重复步骤 3。
5. 用 1×Annexin V 结合缓冲液重悬细胞, 调节其浓度为 1-5 ×10⁶ 细胞/mL。
6. 取 100 μL 的细胞悬液于 5mL 流式管中, 加入 5μL Annexin V-PE、5 μL RedNucleus II, 混匀后于室温避光孵育 15-20min。
7. (可选步骤) 准备两管额外的凋亡细胞, 每管中只加入一

种单染染料 (Annexin V-PE 或 RedNucleus II), 用于流式单染的补偿调节)。

8. 加入 400 μL 1× Annexin V 结合缓冲液, 混匀, 进行流式检测, Annexin V-PE 由 488nm 激光激发, 检测荧光发射光谱在 578 nm 处 (FL2 或 BL2 通道), RedNucleus II 由 638nm 激发, 选择 FL4 或 RL1 通道检测。

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. 为了避免洗涤细胞时损失细胞, 在吸液时可以用大的 Tip 头套上小的 Tip 头吸液。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。