



# Annexin V-EGFP/PI细胞凋亡检测试剂盒

BA1250

<b>Catalog Number:</b>	BA1250																							
<b>Amount:</b>	50次																							
<b>产品简介:</b>	<p>Annexin是一类广泛分布于真核细胞细胞浆内钙离子依赖的磷脂结合蛋白，参与细胞内的信号转导。Annexin V可选择性结合磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, 简称PS)。磷脂酰丝氨酸主要分布在细胞膜内侧，即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期，不同类型的细胞都会把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面，即细胞膜外侧。磷脂酰丝氨酸暴露到细胞表面后会促进凝血和炎症反应。而Annexin V和外翻到细胞表面的磷脂酰丝氨酸结合后可以阻断磷脂酰丝氨酸的促凝血和促炎症反应活性。因此Annexin V被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。用带有绿色荧光的荧光探针EGFP标记的Annexin V，即Annexin V-EGFP，就可以用流式细胞仪或荧光显微镜非常简单而直接地检测到磷脂酰丝氨酸的外翻这一细胞凋亡的重要特征。与FITC的绿色荧光信号相比，EGFP的绿色荧光信号具有信号强，不易淬灭，稳定性高等优点。</p> <p>Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit)是用EGFP标记的重组人Annexin V来检测细胞凋亡时出现在细胞膜表面的磷脂酰丝氨酸的一种细胞凋亡检测试剂盒。可以使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备进行检测。</p> <p>本试剂盒还提供了碘化丙啶染色液，碘化丙啶可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞，呈现红色荧光。对于坏死细胞，由于细胞膜的完整性已经丧失，Annexin V-EGFP可以进入到细胞浆内，与位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸结合，从而使坏死细胞呈现绿色荧光。因此将Annexin V与PI匹配使用，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。</p>																							
<b>试剂盒组份:</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>组份</th> <th>Cat:BA1220 20 assays</th> <th>Cat:BA1250 50 assays</th> <th>Cat:BA12100 100 assays</th> <th>储存条件</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Annexin V-EGFP</b></td> <td>100μL</td> <td>250μL</td> <td>500μL</td> <td>4°C避光</td> </tr> <tr> <td>结合液</td> <td>15 mL</td> <td>40 mL</td> <td>75mL</td> <td>4°C</td> </tr> <tr> <td>碘化丙啶 (PI)</td> <td>100μL</td> <td>250μL</td> <td>500μL</td> <td>4°C避光</td> </tr> </tbody> </table>	组份	Cat:BA1220 20 assays	Cat:BA1250 50 assays	Cat:BA12100 100 assays	储存条件	<b>Annexin V-EGFP</b>	100μL	250μL	500μL	4°C避光	结合液	15 mL	40 mL	75mL	4°C	碘化丙啶 (PI)	100μL	250μL	500μL	4°C避光			
组份	Cat:BA1220 20 assays	Cat:BA1250 50 assays	Cat:BA12100 100 assays	储存条件																				
<b>Annexin V-EGFP</b>	100μL	250μL	500μL	4°C避光																				
结合液	15 mL	40 mL	75mL	4°C																				
碘化丙啶 (PI)	100μL	250μL	500μL	4°C避光																				
<b>试剂盒以外自备仪器和试剂:</b>	流式细胞仪或荧光显微镜、低速离心机、移液器,1.5m L离心管、载玻片、盖玻片、PBS、不含EDTA的胰酶消化液																							

<p><b>操作步骤:</b></p>	<p><b>1、对于悬浮细胞:</b>  A、在进行完细胞凋亡刺激后, 1000g (约1000-2000rpm) 离心5分钟, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。(注意: PBS重悬不能省略, PBS重悬的过程同时也起到了洗涤细胞的作用, 可以保证后续Annexin V-EGFP的结合。)  B、取1~5×10<sup>5</sup>重悬的细胞, 1000g离心5分钟, 弃上清, 注意要把PBS吸干净, (选做步骤: 加入250ul的结合液轻轻重悬细胞, 1000g离心5分钟, 弃上清) 加入500μl 结合液轻轻重悬细胞。  C、加入5μl Annexin V-EGFP, 轻轻混匀; 再加入5 μL 碘化丙啶, 轻轻混匀。  D、室温(20-25℃)避光孵育10分钟。可以使用铝箔进行避光。  E、随即进行流式细胞仪检测, Annexin V-EGFP为绿色荧光, PI为红色荧光。如果用于荧光显微镜下检测, 滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上, 并用盖玻片盖上细胞即可检测。</p> <p><b>2、对于贴壁细胞:</b>  A、把细胞培养液吸出至一合适离心管内, PBS洗涤贴壁细胞一次, 用胰酶细胞消化液(最好不用含有EDTA)消化细胞。(注: 胰酶消化时间不易过长, 否则容易引起假阳性)  B、细胞消化下来后, 加入步骤2A中收集的细胞培养液, 稍混匀, 转移到离心管内, 1000g离心5分钟, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。  C、取1~5×10<sup>5</sup>重悬的细胞, 1000g离心5分钟, 弃上清, 注意要把PBS吸干净, (选做步骤: 加入250ul的结合液轻轻重悬细胞, 1000g离心5分钟, 弃上清) 加入500μl结合液轻轻重悬细胞。  D、加入5μl Annexin V-EGFP, 轻轻混匀; 再加入5 μL 碘化丙啶, 轻轻混匀。  E、室温(20-25℃)避光孵育10分钟。可以使用铝箔进行避光。  F、随即进行流式细胞仪检测, Annexin V-EGFP为绿色荧光, PI为红色荧光。如果用于荧光显微镜下检测, 滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上, 并用盖玻片盖上细胞即可检测。</p> <p><b>3、对于贴壁细胞的原位荧光显微镜检测:</b>  注: 本方法的优点是可以原位观察细胞凋亡, 缺点是部分凋亡由于不贴壁而检测不到。  A、(选做)如果条件许可, 把细胞培养于24孔板、48孔板或96孔板内; 或将细胞于盖玻片上生长, 用适当的凋亡诱导剂诱导细胞凋亡, 并设立阴性对照组。  B、吸除细胞培养液, 加入PBS洗涤两次; 或将盖玻片用PBS洗涤两次。(选做步骤: 用250ul的结合液洗涤盖玻片一遍)  C、在500μL 的结合液中加入5μL Annexin V-EGFP, 5 μL碘化丙啶, 轻轻混匀。  D、将上述溶液滴加于培养板孔中, 或滴加于盖玻片表面, 使长有细胞的盖玻片表面均匀覆盖。  E、室温(20-25℃)避光孵育10分钟; 随即在荧光显微镜下观察, Annexin V-EGFP为绿色荧光, PI为红色荧光。</p>
<p><b>保存条件:</b></p>	<p>4℃保存, Annexin V-EGFP和碘化丙啶染色液需避光保存, 一年有效。为长期保存, 可以把Annexin V-EGFP和碘化丙啶染色液适当分装后-20℃保存, Annexin V-EGFP结合液可以直接-20℃保存。</p>
<p><b>注意事项:</b></p>	<p>1、如果有细菌或真菌污染, 会严重影响检测效果。  2、染色后宜尽快检测, 时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。同时荧光物质均易发生淬灭, 在进行荧光观察时, 尽量缩短观察时间, 同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。  3、如果检测时Annexin V-EGFP的荧光比较弱, 建议用250ul的结合液轻轻重悬洗涤细胞, 去除残余的磷酸盐溶液, 同时也可缩小结合液的体积(比如200ul的体积)来提高Annexin V-EGFP的工作浓度。  4、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。  5、本试剂盒适用于检测活细胞, 流式细胞仪检测时, 细胞数量不应低于1×10<sup>5</sup>, 不适用于检测组织样本。  6、因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同, 因而流式检测的荧光补偿也不同, 因此建议每次检测均需使用未经凋亡诱导处理的细胞作为对照, 进行荧光补偿的调节。  7、用流式细胞仪检测, 激发波长Ex=488 nm; 发射波长Em=530 nm。Annexin V-EGFP的绿色荧光通过FITC通道(FL1)检测; PI红色荧光通过PI通道(FL2或FL3)检测, 建议使用FL3。荧光补偿调节: 使用未经凋亡诱导处理的正常细胞, 作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。</p>