

AnnexinV-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒 C0019

描述:

磷脂酰丝氨酸 (PS) 是一种带负电荷的磷脂, 正常细胞中, PS 只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞膜 PS 由脂膜内侧翻向细胞膜外侧, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。AnnexinV 是一种分子量为 35~36kD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此 AnnexinV 被公认为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。

将 AnnexinV 进行绿色荧光 Alexa Fluor 488 标记, 以标记了的 AnnexinV 作为探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种核酸染料, 它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜, 但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此采用 AnnexinV 与 PI 双染的方法, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 右下象限为早期凋亡细胞, 右上象限是凋亡晚期细胞和坏死细胞。

组成:

20 次

Annexin V-Alexa Fluor 488 100uL

Propidium Iodide 200uL

Binding Buffer (4X) 4mL

储存条件:

2-8°C 避光

所需实验器材:

微量移液器; PBS; 不含 EDTA 的胰酶消化液; 低速离心机; 流式细胞仪

操作说明:

1. 细胞样品的准备:

a) 悬浮细胞:

- 1) 收集细胞至离心管中 1000-2000rpm 离心 5min, 小心去除上清。
- 2) 用 1ml 4°C 预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。
- 3) 再加入 1ml 4°C 预冷的 PBS 重悬细胞, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

b) 贴壁细胞:

1) 吸出细胞培养液至离心管中, PBS 洗涤贴壁细胞一次, 加入适量不含 EDTA 的胰酶细胞消化液消化细胞。

2) 室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时, 吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化。

3) 加入步骤 1 中收集的细胞培养液, 稍混匀, 转移到离心管内, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

注: 加入步骤 1 中的细胞培养液一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞, 另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶; 残留的胰酶会消化并降解后续加入的 Annexin V- Alexa Fluor 488 导致染色失败。

- 4) 用 1ml 4℃ 预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。
- 5) 再加入 1ml 4℃ 预冷的 PBS 重悬细胞, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。
2. 用去离子水按 1: 4 稀释 Binding Buffer (4ml Binding Buffer+12ml 去离子水);
3. 用 250ml 结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度为 1×10^6 /ml;
4. 取 100ml 的细胞悬液于 5ml 流式管中, 加入 Annexin V-Alexa Fluor 488, 轻轻混匀;
5. 室温 (20-25℃) 避光孵育 10min;
6. 上机前 5min 加入 10ml 碘化丙啶溶液, 轻轻混匀;
7. 上机前在反应管中补加 400ml PBS 重悬细胞, 避光保存, 随即进行流式细胞仪 (FACS) 检测, AnnexinV- Alexa Fluor488 为绿色荧光和 PI 为红色荧光。

注意事项:

- 1) 此试剂盒仅供研究使用。
- 2) 微量试剂需离心数秒将试剂收集至管底后再开盖取用。
- 3) Propidium Iodide (PI) 有毒, 操作时要带手套, 使用时避免与皮肤, 眼睛和黏膜接触。
- 4) AnnexinV-Alexa Fluor488 中含有叠氮化钠 (NaN_3), 操作时要带手套, 使用时避免与皮肤, 眼睛和黏膜接触。
- 5) 本试剂盒用于检测活细胞, 流式细胞仪检测时, 细胞数量不应低于 1×10^6 。
- 6) 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。
- 7) Annexin V 检测凋亡细胞的方法适用于悬浮生长的细胞, 如: 淋巴细胞等细胞的检测。对于贴壁生长的细胞, 由于在胰酶等消化处理过程中会造成细胞膜的损伤, 会造成较高的假阳性, 而用细胞刮子会造成细胞粘连成团, 而影响检测, 可将胰酶消化后的细胞保存在含 2%BSA 的 PBS 中, 防止进一步的损伤。尽管目前, 包括国外也有一些单位采用该方法检测贴壁生长的细胞, 但其重复性较差, 且需要操作时非常小心, 。
- 8) 消化贴壁细胞残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-Alexa Fluor 488, 最终导致染色失败。
- 9) 细胞固定后可能导致荧光的淬灭, 请不要固定样品。