

CoraLite® Plus 488-Annexin V 和 PI 细胞凋亡检测试剂盒

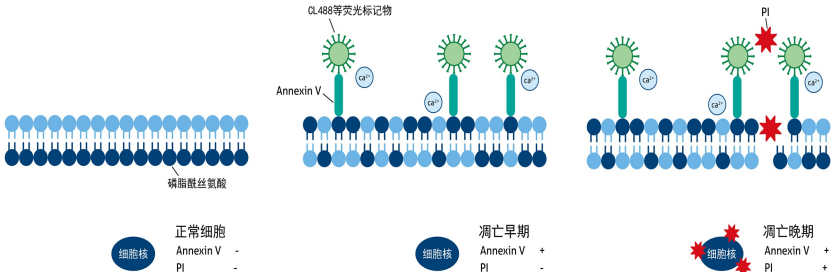
Catalog Number: PF00005

产品介绍

CoraLite® Plus 488-Annexin V 和 PI 细胞凋亡检测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（绿色）和晚期凋亡细胞或坏死细胞（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。

Annexin V 可以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。用绿色荧光探针 CL488 标记的 Annexin V，即 CL488-Annexin V，可以结合外翻的磷脂酰丝氨酸，从而检测凋亡早期的细胞。CL488 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 546nm 的激光激发，呈现红色荧光。



Annexin V/PI 检测细胞凋亡原理图

产品成分

组分	50 T	100 T
1× Annexin V结合缓冲液	50 mL	50 mL × 2
CL488-Annexin V	250 uL	500 uL
PI	500 uL	1 mL

包装规格

保存条件

使用方法

100T/50T

4°C避光冷藏，请勿冻存。本产品在推荐条件下至少可以储存24个月。

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 °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：用胰蛋白酶消化后，将细胞在最佳细胞培养条件和培养基中恢复约 30 min，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 °C下离心5 min，收集1-5×10⁵个细胞并用 100 uL 1×结合缓冲液重悬细胞。
- 每管加入 4-5 uL 的 CL488-Annexin V 和 5 uL 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（CL488-Annexin V 和 PI），用于流式单染的补偿调节。
- 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。
- 每管加入 400 uL 的 PBS 或 1 X 结合缓冲液，尽快通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。CL488-Annexin V 由 488 nm 激光激发，检测荧光发射光谱在 530 nm 处（FITC 通道），PI 通道发射光谱约在 617 nm 处。
注：PBS 或 1× 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。

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 uL 的 1× Annexin V 结合缓冲液中加入 5-25 uL 的 CL488-Annexin V 和 5 uL 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× 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× 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× 结合缓冲液覆盖细胞。

8.使用合适的滤光片观察细胞。CL488-Annexin V 可用 FITC 适用的滤光片，PI可用 Cy3或者 Texas 适用的滤光片。

注意

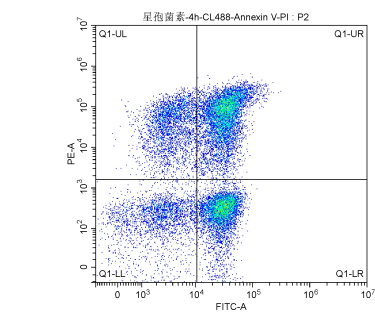
- 1.荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 2.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 3.为确保结果准确，细胞在染色后须尽快完成检测。

光谱特性

CL488-Annexin V: Ex/Em=490/515 nm

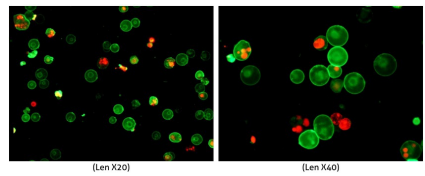
PI: Ex/Em=535/617 nm (with DNA)

Validation Data



流式细胞检测结果: 在SSC/FSC图中分析细胞群体:

X轴选择FITC-A,用来表示CL488-Annexin V。Y轴选择PE-A用来表示。
上图中各个区域的含义:
Q1-UL: (CL488-Annexin V)-/PI+, 此区域的细胞为坏死细胞。也可能有少数的晚期凋亡细胞在其中, 甚至机械损伤的细胞也包含其中。
Q1-UR: (CL488-Annexin V)+/PI+, 此区域的细胞为晚期凋亡细胞。
Q1-LR: (CL488-Annexin V)+/PI-, 此区域的细胞为早期凋亡细胞。
Q1-LL: (CL488-Annexin V)-/PI-, 此区域的细胞为活细胞。
通常统计细胞凋亡率时采用Q1-UR+Q1-LR, 晚期凋亡+早期凋亡群 (即所有Annexin V阳性群)。



免疫荧光检测结果: Green: Staining with CL488-Annexin V for Apoptotic cells or Early apoptotic cells;
Red: Staining with PI for Dead cells;
Yellow: double staining with CL488-Annexin V and PI for Necrotic cell or late apoptotic cells.