

Annexin V-FineTest®647/DAPI 凋亡检测试剂盒

货号: K021

规格: 20T/50T/100T

试剂盒组份:

Reagents	20T	50T	100T
Annexin V-FineTest®647	100μL	250μL	500μL
1X Binding Buffer	10mL	25mL	50mL
DAPI	100μL	250μL	500μL

保存条件:

2-8°C 保存一年。Annexin V-FineTest®647 和 DAPI 试剂要避光保存, 禁止冷冻保存

运输条件: 冰袋

实验原理:

Annexin V-FineTest®647/DAPI 细胞凋亡检测试剂盒可检测悬浮细胞和贴壁细胞的凋亡情况。

Annexin V 是一种钙依赖性磷脂酰丝氨酸结合蛋白, 对磷脂酰丝氨酸 PS 具有高亲和力, Annexin V-FineTest®647 可以通过暴露在细胞外的 PS 与早期凋亡细胞的细胞膜结合。细胞凋亡可通过流式细胞术或荧光显微镜检测。

由于凋亡晚期或坏死细胞膜丧失完整性, 而 4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐 (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, DAPI) 可与双链 DNA 特异性结合并产生强烈的荧光, 与 AnnexinV 搭配使用, 可区分处于不同凋亡时期的细胞。

实验步骤:

A. Annexin V-FineTest®647 与细胞孵育

1. 按照实验方案诱导细胞凋亡。300 g 离心 5 分钟, 丢弃上清, 收集细胞, 用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。
2. 离心收集 $1-5 \times 10^5$ 个细胞, 丢弃上清。PBS 洗涤细胞 1 次, 离心后弃上清。
3. 用 500μl 1X Binding Buffer 重悬细胞。
4. 加入 5μl Annexin V-FineTest®647 和 5μl DAPI。
5. 轻轻涡旋混匀, 室温避光孵育 15 分钟。
6. 立即检测, 如果不能及时检测, 请放冰上避光静置并在 1 小时内完成检测。

B. 流式细胞术定量

流式细胞术分析 Annexin V-FineTest®647，可用 APC 信号检测器，DAPI 检测优先选择 DAPI 通道，其次是 Pacific Blue 通道。

对于贴壁细胞，首先收集细胞培养液，PBS 洗涤细胞一次后用胰酶消化细胞，然后加入收集的细胞培养液，把细胞轻轻吹下来，离心弃上清，细胞用 PBS 重悬并计数，之后进行步骤 A. 2-5。

C. 荧光显微镜检测

将步骤 A. 5 中的细胞悬液涂布在载玻片上。用盖玻片盖住细胞。

如果分析贴壁细胞，直接在细胞爬片上培养细胞。孵育后 (A. 5)，将细胞爬片倒置在玻片上，观察细胞。

注意事项:

1. 染色后应尽快检测。时间过长可能导致凋亡或坏死细胞数量增加。
2. 检测贴壁细胞时，应收集诱导凋亡后产生的悬浮细胞与随后收集的贴壁细胞一起检测。
3. 尽量避免消化贴壁细胞造成的机械损伤。同时，胰酶的消化液应尽可能不含 EDTA，因为 EDTA 影响 Annexin V 与磷脂酰丝氨酸的结合。
4. 如果使用含有 EDTA 的胰酶，收集后应彻底清洗细胞，以确保 EDTA 被去除。
5. 荧光物质容易猝灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和储存过程中也要尽量注意保光。
6. 为了您的安全和健康，请穿上实验服，戴上一次性手套。
7. 本产品仅供科学研究使用。