上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

AnnexinVAlexaFluor647/PI 凋亡检测试剂盒

货号：R32126

规格：20T，50T，100T

保存温度：2-8°C，有效期 12 个月。

产品组成：

产品内容	R32126-20T	R32126-50T	R32126-100T
Annexin V/Alexa Fluor 647	100μl	250μl	500μl
Propidium iodide(PI)(20μg/ml)	100μl	250μl	500μl
Binding Buffer（10×）	2ml	5ml	10ml

产品简介：

细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面，这些细胞膜表面的改变之一是磷脂酰丝氨酸（PS）从细胞膜内转移到细胞膜外，使 PS 暴露在细胞膜外表面。PS 是一种带负电荷的磷脂，正常主要存在于细胞膜的内面，在细胞发生凋亡时细胞膜上的这种磷脂分布的不对称性被破坏而使 PS 暴露在细胞膜外。Annexin V 具有易于结合到磷脂类如 PS 的特性，对 PS 有高度的亲和性。因此，该蛋白可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS。PS 转移到细胞膜外不是凋亡所独特的，也可发生在细胞坏死中。两种细胞死亡方式间的差别是在凋亡的初始阶段细胞膜是完好的，而细胞坏死在其早期阶段细胞膜的完整性就破坏了。因此，可以采用 AnnexinV 与 PI 双染的方法，通过流式检测细胞早期凋亡。

操作步骤: (仅供参考)

1、 细胞样品的准备：

a)对于贴壁细胞：小心收集细胞培养液到一离心管内备用。用不含 EDTA 的胰酶消化细胞，至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时，加入前面收集的细胞培养液，吹打下所有的贴壁细胞，并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。1000rpm 左右离心 5min，沉淀细胞。对于特定的细胞，如果细胞无法完全离心至离心管底，可以适当延长离心时间或稍加大离心力。小心吸除上清，可以残留约 50μl 左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1ml 4°C 预冷的 PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清。

b)对于悬浮细胞：1000rpm 左右离心 5min，沉淀细胞。对于特定的细胞，如果细胞无法完全离心至离心管底，可以适当延长离心时间或稍加大离心力。小心吸除上清，可以残留约 50μl 左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1ml 4°C 预冷的 PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清。

2、 用去离子水按 1:9 稀释结合缓冲液（2 ml 10×结合缓冲液+18ml 去离子水）。

3、 用 1×结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为 1-5×10 6 /ml。

4、 取 100μl 的细胞悬液于 5ml 流式管中，加入 5μl Annexin V/Alexa Fluor 647 混匀后于室温避光孵育 5 分钟。

5、 加入 5μl 20μg/ml 的碘化丙啶溶液（PI），并加 400μlPBS，立刻进行流式检测。

实验设计：

1)未转染细胞

空白管：阴性对照组细胞，不加 Annexin V/Alexa Fluor647，碘化丙啶溶液（PI）。用于调节电压。

检测管：处理的细胞，加 Annexin V/Alexa Fluor 647，碘化丙啶溶液（PI）。用空白管和单染管调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

注：无需单染管 Annexin V/Alexa Fluor 647 调补偿。

2)转染 GFP 细胞

未转染空白管：未转染细胞，不加 Annexin V/Alexa Fluor647，碘化丙啶溶液（PI）。用于调电压。

转染 GFP 空白管：转染 GFP 对照组细胞，不加 Annexin V/Alexa Fluor 647，碘化丙啶溶液（PI）。用于调补偿。

检测管：处理的细胞，加 Annexin V/Alexa Fluor 647，碘化丙啶溶液（PI）。调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。