Annexin V-APC/PI 细胞凋亡检测试剂盒（20/50/100T）

目录号：ANT004-005-006-PI
规　格：20 /50 /100 Tests
储　存：2-8℃避光保存，勿冰冻。一年质保。

简介：正常活细胞的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)只分布在质膜磷脂双分子层的内侧。当细胞开始发生早期凋亡时，细胞膜脂质的不对称性消失，导致PS自质膜内层翻转至外层，从而暴露在细胞表面。Annexin V是一种36 kDa的钙依赖性的磷脂结合蛋白，对PS有高度的亲和性。因此，荧光标记的 Annexin V可用于检测暴露于早期凋亡细胞表面的PS。当细胞处于中晚期凋亡或发生坏死时，由于细胞膜的破裂，Annexin V可以进入细胞内部与质膜上的PS结合。 因此，为了区分活细胞、早期凋亡细胞和中晚期凋亡细胞 (或坏死细胞)，可通过将荧光标记 Annexin V与核酸染料联合使用：活细胞和早期凋亡细胞的细胞膜仍然完整，核酸染料无法进入细胞内部与核酸结合，而中晚期凋亡细胞 (或坏死细胞)由于细胞膜的破裂，核酸染料可进入细胞内部而核酸结合，通过流式细胞术检测细胞中 Annexin V和核酸染料的荧光强度，可区分活细胞 (Annexin V-/核酸染料-)、早期凋亡细胞 (Annexin V+/核酸染料-)与中晚期凋亡细胞 (或坏死细胞) (Annexin V+/核酸染料+)。

组份：

	20 Tests	**50 Tests**	**100 Tests**
4X结合缓冲液 Binding Buffer (4X)：	4ml	10ml	20ml
Propidium Iodide (20μg/ml)：	200μl	500μl	1ml
Annexin V-APC：	100μl	250μl	500μl

应用：Flow Cytometric Analysis

步骤：使用本试剂盒时，需自备1×PBS缓冲液。

1. 细胞样品的准备：

对于贴壁细胞：

1) 取细胞培养瓶，用移液器小心地吸取细胞培养液，转移到一个干净的离心管内备用；
2) 用不含EDTA的胰蛋白酶消化细胞，至细胞可以被移液器轻轻吹打下来时，加入收集的细胞培养液，终止消化；
3) 用移液器吹打下所有的贴壁细胞，并轻轻吹散细胞；
4) 将细胞收集到离心管内，1000rpm左右离心5min，沉淀细胞(根据待测细胞特性，可适当调整离心时间或离心力)；
5) 用移液器小心吸除上清，可保留约50μl左右的培养液，避免吸走细胞；
6) 加入约1ml 4℃预冷的1×PBS缓冲液重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清；

对于悬浮细胞：

1) 将细胞收集到离心管内，1000rpm左右离心5min，沉淀细胞(根据待测细胞特性，可适当调整离心时间或离心力)；
2) 用移液器小心吸除上清，可保留约50μl左右的培养液，避免吸走细胞；
3) 加入约1ml 4℃预冷的1×PBS缓冲液重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清；

2. 根据实验用量，按1:3的比例用去离子水将4×结合缓冲液稀释成1×结合缓冲液，用于后续实验； (e.g. 若需要16ml 1×结合缓冲液，则取4ml 4×结合缓冲液+12ml去离子水)；
3. 用1×结合缓冲液重悬细胞，将细胞密度调节至1-5×10^6/ml；
4. 取100μl的细胞悬液于5ml流式管中，加入5μl rh Annexin V APC，用移液器轻柔吹吸混匀，室温避光孵育5min；
5. 加入10μl PI，并加400μl 1×PBS缓冲液，立刻进行流式检测。

注：实验过程中应注意轻柔吹吸细胞，避免造成细胞机械损伤；加入步骤5中的PI溶液和1×PBS缓冲液后，建议立即上机检测，若无法立即上机，应将细胞置于4℃条件下避光保存，并在1h内上机检测，避免长时间放置导致检测结果不准确。

样本分析： APC的最大激发波长是650nm，最大发射波长是668nm；PI-DNA复合物的最大激发波长是535nm，最大发射波长为615nm。 用 FlowJo 等软件进行分析，绘制双色散点图（two-color dot plot），APC为横坐标，PI为纵坐标。典型的实验中，细胞可以分成三个亚群，活细胞仅有很低强度的背景荧光，早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光，晚期凋亡或坏死的细胞有绿色和红色荧光双重染色。

相关产品：
ANT002 Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒（50T）
ANT003 Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒（100T）
ANT004 Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒（20T）
ANT005 Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒（50T）
ANT006 Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒（100T）
ANT007 Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒（20T）
ANT008 Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒（50T）