Annexin V-Cyanine5/DAPI Apoptosis Kit

Cat. No: E-CK-A262 **Size: 20 Assays/50 Assays/100 Assays/200 Assays**

产品编号	产品名称	20 Assays	50 Assays	100 Assays	200 Assays	Storage
E-CK-A121	Annexin V-Cyanine5 Reagent	100 μL	250 μL	500 μL	1 mL	2~8℃, Shading light
E-CK-A151	Annexin V Binding Buffer(10×)	1.4 mL×2	5.5 mL	11 mL	11 mL×2	2~8°C
E-CK-A163	DAPI Reagent (25μg/mL)	100 μL	250 μL	500 μL	1 mL	2-8°C/-20°C, shading light
	说明书			一份		

保存条件

2~8℃可保存 1 年。Annexin V-Cyanine5 禁止冷冻保存。

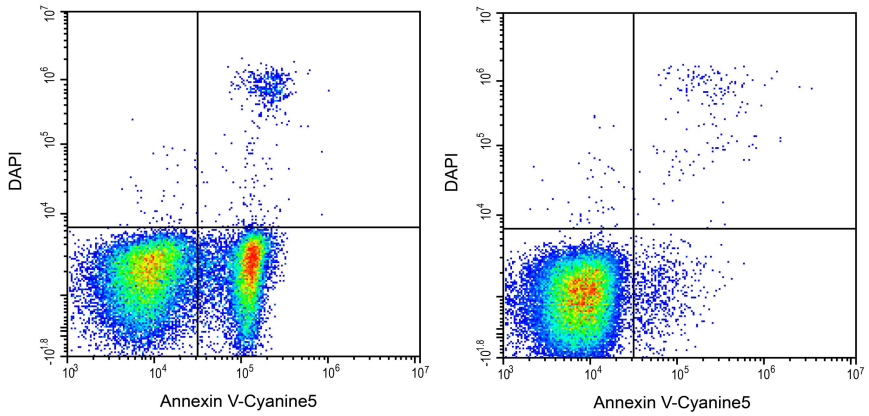
实验原理

Elabscience®自主研发的 Annexin V-Cyanine5/DAPI Apoptosis Kit，可用于检测悬浮细胞和贴壁细胞的凋亡。

Annexin V 是一种钙离子依赖性磷脂结合蛋白，与磷脂酰丝氨酸（PS）有高度亲和力。当细胞发生凋亡时，膜内侧的磷脂酰丝氨酸（PS）外翻到膜表面，而被荧光染料 Cyanine5 标记的 Annexin V 结合，可通过流式细胞仪或荧光显微镜进行检测。

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 Annexin V 搭配使用，可区分处于不同凋亡时期的细胞。

本试剂盒检测喜树碱诱导的 Jurkat 细胞凋亡效果如下图所示：



Jurkat 细胞用 5 μM 喜树碱（Camptothecin）(左) 或未加药 (右) 处理 4 h，本试剂盒染色后流式检测。Annexin V-Cyanine5 单阳细胞为早期凋亡细胞，Annexin V-Cyanine5 和 DAPI 双阳细胞为坏死或晚期凋亡细胞，DAPI 单阳细胞为裸核细胞。

试剂配制

1×Annexin V Binding Buffer：取 1 mL Annexin V Binding Buffer (10×)加入 9 mL 去离子水中混匀。

实验操作

Annexin V 实验对照设置参考（微信扫码观看）。

一步法

1. 细胞按照实验方案进行凋亡诱导，300 ×g 离心 5 min，弃上清，收集细胞，PBS 洗涤一次，轻轻重悬细胞并计数。
2. 取 1~10× 10^5 重悬的细胞，300 ×g 离心 5 min，弃上清。用 PBS 洗涤细胞一次，离心后弃上清，加入 500 μL 稀释的 1 × Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。
3. 细胞悬液中加入 5 μL 的 Annexin V-Cyanine5 Reagent 和 5 μL 的 DAPI Reagent (25μg/mL)。
4. 轻柔涡旋混匀后，室温避光孵育 15~20 min。
5. 立即上机检测。如不能及时检测，请于冰上避光静置并于 1 小时内完成检测。

注：流式细胞仪检测时 Annexin V-Cyanine5 可用 APC 通道，DAPI 优先选 DAPI 通道，其次是 Pacific Blue 通道。

两步法

1. 细胞按照实验方案进行凋亡诱导，300 ×g 离心 5 min，弃上清，收集细胞，PBS 洗涤一次，轻轻重悬细胞并计数。
2. 取 1~10× 10^5 重悬的细胞，300 ×g 离心 5 min，弃上清。用 PBS 洗涤细胞一次，离心后弃上清，加入 100 μL 稀释的 1 × Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。
3. 细胞悬液中加入 2.5 μL 的 Annexin V-Cyanine5 Reagent 和 2.5 μL 的 DAPI Reagent (25μg/mL)。（由于两步法分辨率更高，染色液用量减半依然可得到媲美一步法的效果；用户亦可根据自己的模型进行滴定后加入适量的染色液，用更少的量获得高质量的结果。）
4. 轻柔涡旋混匀后，室温避光孵育 15~20 min。
5. 加入 400 μL 稀释的 1 × Annexin V Binding Buffer，混匀样本。
6. 立即上机检测。如不能及时检测，请于冰上避光静置并于 1 小时内完成检测。

注：流式细胞仪检测时 Annexin V-Cyanine5 可用 APC 通道，DAPI 优先选 DAPI 通道，其次是 Pacific Blue 通道。

注意事项

1. 本产品仅供科研使用。
2. 检测贴壁细胞时，需收集诱导凋亡后产生的悬浮细胞，并与后续收集的贴壁细胞一起检测。
3. 应尽量避免消化贴壁细胞带来的机械损伤。同时，胰酶的消化液中应尽量不含 EDTA，因为 EDTA 会影响 Annexin V 与磷脂酰丝氨酸的结合。
4. 如果使用含 EDTA 的胰酶，收集细胞后应充分清洗，确保 EDTA 被去除干净。
5. 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。
6. 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。