产品说明书

488-Annexin V/RedNucleus II 细胞凋亡试剂盒

产品货号：SB-Y6102S/Y6102M/Y6102L

产品规格：10T, 50T, 100T

产品内容：

组分	SB-Y6102S (10T)	SB-Y6102M (50T)	SB-Y6102L (100T)
A. 1 × Annexin V 结合缓冲液	10 mL	50 mL	50 mL×2
B. 488-Annexin V	50 μL	250 μL	500 μL
C. RedNucleus II	100 μL	500 μL	1 mL

储存条件

4°C避光冷藏，请勿冻存。有效期见外包装。

光谱特性

488-Annexin V: Abs/Em=490/515 nm

RedNucleus II: Ex/Em=635/695 nm

产品介绍

488-Annexin V和RedNucleus II凋亡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（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。

488-Annexin V 可以标记早期凋亡细胞。Annexin V 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 会外翻到细胞膜外侧。用绿色荧光探针 488 标记的 Annexin V, 即 488-Annexin V, 可以结合外翻的磷脂酰丝氨酸，从而检测细胞凋亡的重要特征。488 染料与 FITC 相比，荧光亮度更高，且不受环境中 pH 的影响，光稳定性好。

RedNucleus II 是一种非渗透性的远红光 DNA 结合染料，不能透过活细胞和早期凋亡细胞完整的细胞膜，但是可以快速染色晚调和死亡细胞中的细胞核/dsDNA。与

488-Annexin V 联用时，Red Nucleus II 被排除在活细胞和早期凋亡细胞外，而晚期凋亡细胞则同时被 488-Annexin V 和 RedNucleus II 结合染色呈现双阳性。

488 与 **RedNucleus II** 之间光谱无交叉，对于无自发荧光、自带 **RFP** 或阿霉素诱导凋亡的细胞，都无需补偿调节。

使用方法

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。

1. 流式细胞检测

(1) 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。

(2) 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，然后300 g, 4°C离心5 min 收集细胞，胰酶消化时间不宜过长，以防引起假阳性。

注：用胰蛋白酶消化后可使细胞在最佳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。

(3) 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 $1-5 \times 10^5$ 个细胞并用100 μ L 1 $\times$ Annexin V 结合缓冲液重悬细胞。

(4) 每管加入4-5 μ L 的 488 -Annexin V 和 5 μ L 的 RedNucleus II 工作液。

注：我们推荐额外准备三管凋亡诱导的细胞，一管不加染料，调节FSC、SSC电压，另外两管中分别加入一种染料

(488-Annexin V 或 RedNucleus II)，用于通道电压调节。

(5) 室温避光孵育15-20 min，为避免影响细胞凋亡进程，孵育过程可在冰上进行。

(6) 孵育结束后，每管加入400 μ L的PBS或1 $\times$ Annexin V 结合缓冲液，尽快通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。488-Annexin V由488 nm 激光激发，检测荧光发射光谱在530 nm 处 (FITC 通道)，RedNucleus II 通道发射光谱约在695 nm 处，可选择 FL4/RL1 通道。(注：可根据不同凋亡处理以及不同细胞选择PBS或1 $\times$ Annexin V 结合缓冲液进行重悬)。

2. 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1 $\times$ Annexin V结合缓冲液，但是使用浓度需要重新优化。

(4) 每100 μ L的1 $\times$ Annexin V结合缓冲液中加入5-25 μ L的488 -Annexin V和5 μ L的RedNucleus II。

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。为避免影响细胞凋亡进程，孵育过程可在冰上进行，但孵育时间至少延长至30 min。

(6) 用1 $\times$ Annexin V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 $\times$ Annexin V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 $\times$ Annexin V结合缓冲液覆盖细胞。

(8) 使用合适的滤光片观察细胞。488-Annexin V可用FITC适用的滤光片，RedNucleus II可用Cy 5.5适用的滤光片。

注意事项

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。