

细胞凋亡检测 Kit (AO/PI) 说明书

货号: FB11321

保存: Store at -20°C, 1 year

产品简介

AO/PI 双染是一种经典的细胞凋亡检测方法,通过荧光显微镜观察可区分正常细胞和凋亡细胞。染色后在荧光显微镜下观察, AO 可透过正常细胞膜,使细胞核呈绿色或黄绿色均匀荧光;而在凋亡细胞中,因染色质固缩或断裂为大小不等的片断,形成凋亡小体。AO 使其染上致密浓染的黄绿色荧光或黄绿色碎片颗粒;而坏死细胞黄荧光减弱甚至消失。AO 染色常与 PI 染色合用双染, PI 是一种非细胞膜通透性荧光染料,不能穿过具有生物活性的细胞质膜,只能对于坏死细胞因为其细胞膜缺乏完整性而能到达细胞核,并嵌入坏死细胞的 DNA 双螺旋形成 PI-DNA 复合物从而产生红色荧光,因此 PI 仅能对坏死细胞染色,因此被用来区分正常细胞与坏死细胞。

产品组份

试剂盒组份	含量	保存
试剂一 1mg/mL AO 染色液	1mL	-20°C, 避免反复冻融
试剂二 1mg/mL PI 染色液	1mL	-20°C, 避免反复冻融
试剂三 细胞缓冲液	100mL	2-8°C

检测原理

AO 可透过活细胞和早期凋亡细胞的细胞膜,与 DNA 结合呈绿色荧光,与 RNA 结合呈橙红色荧光。PI 仅能透过细胞膜破损的晚期凋亡细胞或死细胞,与 DNA 结合呈红色荧光。

通过荧光颜色和强度区分活细胞(绿色)、早期凋亡细胞(绿色 / 橙红色)、晚期凋亡 / 死细胞(红色)。

使用说明 (仅供参考)

*标记的条件因细胞种类而异,在每次实验前,请先确定最佳条件。以下方法仅供参考。

AO 单独染色

1. 收集细胞(采用流式细胞仪检测时,应先固定细胞),用试剂三 细胞缓冲液清洗细胞 1 次,加入适量的 细胞缓冲液 重悬细胞,计数并调节细胞浓度至 10^6 /mL。
2. 取适量的细胞悬液和细胞缓冲液,轻轻混匀。
3. 室温避光染色 15min,滴加于载玻片上并加盖玻片或上流式细胞仪分析。
4. 荧光显微镜下观察(激发滤光片波长 488nm,阻断滤光片波长 515nm),计数并拍照。

AO/PI 双染色

1. AO/PI 染色工作液制备: AO、PI 染色液按照 1: 1 混匀 ($100\mu\text{g/mL}$ AO + $100\mu\text{g/mL}$ PI,

用 细胞缓冲液 现配现用)

2. 收集细胞，用细胞缓冲液清洗细胞 1 次，加入适量的细胞缓冲液重悬细胞，计数并调节细胞浓度至 $10^6/\text{ml}$ 。
3. 取适量的细胞悬液和 AO/PI 染色工作液，轻轻混匀。

荧光显微镜观察

取 10 μL 染色细胞悬液滴于载玻片，加盖玻片，立即在荧光显微镜下观察。

激发光设置：

AO（绿色）：488nm 激发光，515-530nm 发射光滤镜。

PI（红色）：535nm 激发光，615nm 以上发射光滤镜。

细胞形态判断：

活细胞：细胞膜完整，核呈均匀绿色荧光，形态规则。

早期凋亡细胞：核呈绿色荧光，可见核固缩、碎片化（染色质凝集）。

晚期凋亡 / 死细胞：细胞膜破损，PI 渗入，核呈红色荧光，形态不规则。

流式细胞术检测：

染色后细胞直接上流式细胞仪，用 488nm 激光激发。

参数设置：

FL1 通道（530/30nm）检测 AO 绿色荧光（活细胞 + 早期凋亡）

FL3 通道（>670nm）检测 PI 红色荧光（晚期凋亡 + 死细胞）

注意事项

1. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
2. 细胞加载所需指标的确切浓度必须根据经验确定。为避免因过载和潜在染料毒性引起的任何伪影，建议使用可产生足够信号强度的小探针浓度。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。请勿存放于普通住宅区。