**吖啶橙/溴化乙锭双荧光染色试剂盒说明书**

**产品简介：**

 细胞凋亡(Apoptosis)的检测方法有形态学、生物化学、D N A 片段化检测方法以及T U N EL 等标记片段化 D N A 方法，但从细胞凋亡概念产生的历史及准确性方面考虑，使用显微镜进行的形态学观察也是很重要的。细胞死亡的检测可以通过荧光色素染色区分活细胞、死细胞，测定细胞代谢活性和形态学观察。这些方法都是利用细胞凋亡这种情况进行测定的，因而不一定反映实际情况， M T T 法是测定线粒体中特有酶的活性，反映细胞数目的变化，其结果与细胞死亡的数目未必完全一致。

 Acridine Orange 属于三环杂芳香燃料，可以标记 D N A、RNA，属于异染性荧光染料，A O 常用于细胞内 D N A 和 R N A 进行检测，A O 与核酸结合方式主要有：1、插入性结合，A O 嵌入核酸双链的碱基对之间，这种结合方式主要为 A O 与 D N A 的结合，其荧光发射峰为 530n m，激发后呈绿色荧光；2、静电吸引，带正电荷的 A O 与单链核酸的磷酸根(带负电荷)产生静电间的吸引结合，这种结合方式主要为 A O 与 R N A 的结合，其荧光发射峰为640 n m，激发后呈红色荧光，少量结合会呈桔黄色或桔红色荧光。因此 AO 嵌合到双链D N A 分子中显绿色，与 DN A 单链或 R N A 结合时发橙红色荧光；Ethidium Bromide 嵌合到双链 D N A 或 R N A 的碱基对中，无碱基特异性，发红色荧光；A O 可透过活细胞膜，EB不能通过与活细胞膜具有相同通透性的细胞膜。

**产品组份：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  编号名称 | RC20292100T | Storage |
| 试剂(A): A O Solution | 200μ l | 4℃ 避光 |
| 试剂(B): EB Solution | 200μ l | R T |
| 试剂(C): A O/EB Dilution B uffer | 50 ml | 4℃ 避光 |
| 使用说明书 | 1 份 |

**自备材料：**

1、 荧光显微镜、 细胞计数板

2、 载玻片、盖玻片

3、 PBS

**操作步骤**(仅供参考)：

1. 收集细胞，用 PBS 清洗细胞 1 次，加入适量的 P BS 重悬细胞，计数并调节细胞浓度至(0.2~5)×106/ ml。

2、配制 AO/EB 工作液：取适量的试剂(A)、试剂(B)、试剂(C)，按照试剂(A):试剂(B):试剂(C)=1:1:8 的比例稀配制成 A O/EB 工作液。

3、每 25 ~ 50μ l 细胞悬液中加入 A O/EB 工作液 2μl，混合均匀，试问孵育 5 ~ 15 min。

4、取洁净载玻片，滴加上 5~10μl 细胞悬液，轻轻盖上盖玻片。

5、在荧光显微镜 B 域进行观察。

**染色结果：**

|  |  |
| --- | --- |
| 活细胞  | 绿色荧光 |
| 死细胞  | 橙色荧光 |

**注意事项：**

1、用能通过活细胞膜与DNA结合后发蓝色荧光的 Hoechst 33342和只能通过死细胞与DNA 结合后发红色荧光的 Propidium Iodide对细胞进行双染的方法也比较常用。

2、如有低温离心机进行离心效果更佳。

3、操作过程中应注意减少试剂(A)、试剂(B)暴露于强光下的时间。

4、EB Solution 有一定毒性，请小心操作。

5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期：** 6 个月有效。4℃运输，4℃保存。