

Annexin V-Alexa Fluor 647/7-AAD Apoptosis Detection Kit

Annexin V-Alexa Fluor 647/7-AAD 凋亡检测试剂盒

产品简介

Annexin V-Alexa Fluor 647/7-AAD 凋亡检测试剂盒，以荧光染料 Alexa Fluor 647/7-AAD 标记的 Annexin V 作为探针，检测细胞早期凋亡的发生，可用荧光显微镜、流式细胞仪或其他荧光检测设备进行检测。

检测原理：在正常的活细胞中，磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine, PS）位于细胞膜的内侧，但在早期凋亡的细胞中，PS 从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中。Annexin-V（膜联蛋白-V）是一种分子量为 35-36KD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，能与 PS 高亲和力结合，可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。

7-AAD 可用来区分存活的早期细胞和坏死或晚期凋亡细胞。7-AAD 是一种核酸染料，同 PI 有着相似的荧光特性，但其发射光谱较 PI 窄，对其他检测通道的干扰更小，在多色荧光分析中是 PI 的最佳替代品，可与 Annexin V 联合使用。该染料不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜，但可穿透晚期凋亡细胞或者坏死细胞并与其内的 DNA 结合。因此将 Annexin V-Alexa Fluor 647 与 7-AAD 联合使用时，7-AAD 则被排除在活细胞（Annexin V-/7-AAD-）和早期凋亡细胞（Annexin V+/7-AAD-）之外，而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 Annexin V-Alexa Fluor 647 和 7-AAD 结合染色呈现双阳性（Annexin V+/7-AAD+）。

产品规格

货号	C331401E/C331401S/C331401M
规格	20 T/50 T/100 T

组分信息

组分编号	组分名称	C331401E	C331401S	C331401M
C331401-A	Annexin V-Alexa Fluor 647	100 μL	250 μL	500 μL
C331401-B	7-AAD Viability Staining Solution (20 $\mu\text{g/mL}$)	200 μL	500 μL	1 mL
C331401-C	4×Binding Buffer	4 mL	10 mL	20 mL

储存条件

2~8℃储存，勿冰冻。Annexin V-Alexa Fluor 647、7-AAD 需避光存储。有效期 1 年。

注意事项

1. 由于细胞凋亡是一个快速的过程，建议样品在染色后 1 小时之内进行分析。
2. 贴壁细胞的消化是一个关键步骤。贴壁细胞诱导细胞凋亡时如有漂浮细胞，需收集漂浮细胞和贴壁细

胞后合并染色。处理贴壁细胞时要小心操作，尽量避免机械损伤。消化时将胰酶铺满孔板底后，轻摇使胰酶与细胞充分接触，然后倒掉大部分胰酶，利用剩余的少量胰酶再消化一段时间，待细胞间空隙增大，瓶底呈花斑状即可终止。尽量不用含 EDTA 的胰酶消化液，EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合。

3. 如果样品来源于血液，请务必除去血液中的血小板。血小板含有 PS，可与 Annexin V 结合，从而干扰实验结果。可以使用含有 EDTA 的缓冲剂并以 200 g 离心洗去血小板。
4. 试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体集中至管底，避免开盖时液体洒落引起损失。
5. Annexin V-Alexa Fluor 647 和 PI 是光敏物质，操作时请注意避光。
6. 7-AAD 为潜在致癌物，为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
7. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 样品染色

- 1) 悬浮细胞：300 g，4℃离心 5 min 收集细胞。贴壁细胞：用不含 EDTA 的胰酶消化后，300g，4℃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。
- 2) 配制 1×Binding Buffer：用去离子水 4 倍稀释 4×Binding Buffer（4 mL 结合缓冲液+12 mL 去离子水）。
- 3) 用 4℃预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每次均需 300 g，4℃离心 5 min。
- 4) 加入 1×Binding Buffer 重悬细胞，调节其浓度为 $1-5 \times 10^6$ 细胞/mL。
- 5) 取 100 μ L 细胞悬液于 5 mL 流式管中，加入 5 μ L Annexin V-Alexa Fluor 647，轻轻混匀后于室温避光孵育 5min。
- 6) 加入 10 μ L 7-AAD（20 μ g/mL）。
- 7) 加入 400 μ L PBS Buffer，混匀，样品在 1 小时内检测。

【注意】为了避免洗涤细胞时损失细胞，在吸液时可以用大的 Tip 头套上小的 Tip 头吸液。

2. 观察检测

1) 流式细胞仪

用流式细胞仪检测，Annexin V-Alexa Fluor 647 的激发波长 Ex=651nm，发射波长 Em=672 nm；7-AAD 的激发波长 Ex=546 nm；发射波长 Em=647 nm。用 CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图（two-color dot plot），Alexa Fluor 647 为横坐标，7-AAD 为纵坐标。荧光补偿调节：使用未经凋亡诱导处理的正常细胞，作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

2) 荧光显微镜

- a. 滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。
- b. 用 PBS 洗涤细胞两次。
- c. 在 500 μ L 的 Binding Buffer 中加入 1 μ L Annexin V-Alexa Fluor 647，5 μ L 7-AAD 染液混匀。
- d. 将上述溶液滴加于盖玻片表面，使长有细胞的盖玻片表面均匀覆盖。
- e. 室温避光孵育 5 min。
- f. 将盖玻片倒置于载玻片上，在荧光显微镜下用双色滤光片观察。