

Annexin V-FITC/7-AAD Apoptosis Detection Kit

Annexin V-FITC/7-AAD 凋亡检测试剂盒

产品简介

Annexin V-FITC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒是用绿色荧光染料 FITC (Phycoerythrin) 标记的 Annexin V 作为探针, 来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 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-FITC 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-FITC 和 7-AAD 结合染色呈现双阳性 (Annexin V+/7-AAD+)。

产品规格

货号	C331403E/C331403S/C331403M
规格	20 T/50 T/100 T

组分信息

组分编号	组分名称	C331403E	C331403S	C331403M
C331403-A	重组人 Annexin V-FITC (rh Annexin V-FITC) *	100 μL	250 μL	500 μL
C331403-B	7-AAD Viability Staining Solution (20 $\mu\text{g/mL}$)	200 μL	500 μL	1 mL
C331403-C	4 $\times$ Binding Buffer	4 mL	10 mL	20 mL

*来源于大肠杆菌 (E. coli), 分子量为 35.8 KDa, 纯度 >98% (SDS-PAGE & HPLC)

储存条件

2~8 $^{\circ}\text{C}$ 储存, 勿冰冻。Annexin V-FITC、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

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-FITC 和 7-AAD 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°C 离心 5 min 收集细胞。贴壁细胞：用不含 EDTA 的胰酶消化后，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。
- 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°C 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每次均需 300 g，4°C 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-FITC，轻轻混匀后于室温避光孵育 5 min。
- 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

Annexin V-FITC 的激发波长 $\lambda_{ex}=488\text{nm}$ ，发射波长 $\lambda_{em}=525\text{ nm}$ ，建议使用 FL1 通道检测；7-AAD 的激发波长 $\lambda_{ex}=546\text{ nm}$ ；发射波长 $\lambda_{em}=647\text{ nm}$ ，发出红色荧光，建议使用 FL3 通道检测。用 CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图（two-color dot plot），FITC 为横坐标，7-AAD 为纵坐标。每个样采集 10,000 events。典型的实验中，细胞可以分成三个亚群，活细胞仅呈现很低强度的背景荧光，早期凋亡细胞仅呈现较强的绿色荧光，晚期凋亡细胞呈绿色和红色荧光双重染色。

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-FITC，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。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色；7-AAD 荧光信号呈红色。