

Annexin V-PE/7-AAD Apoptosis Detection Kit

Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Annexin V-PE/7-AAD Apoptosis Detection Kit	40310ES20	20 T
Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒	40310ES50	50 T
	40310ES60	100 T

产品描述

Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒是用红色荧光染料 PE (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。

其检测原理为: 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。

另外, 本试剂盒中提供的 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-PE 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-PE 和 7-AAD 结合染色呈现双阳性 (Annexin V+/7-AAD+)。

产品组分

编号	组分名称	产品编号/规格		
		40310ES20 (20T)	40310ES50 (50T)	40310ES60 (100T)
40310-A	重组人 Annexin V/PE* (rh Annexin V/PE)	100 μ L	250 μ L	500 μ L
40310-B	7-AAD Viability Staining Solution (20 μ g/mL)	200 μ L	500 μ L	1.0 mL
40310-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)

运输与保存方法

冰袋 (wet ice) 运输。本试剂盒中所有组分均在 4 $^{\circ}$ C 保存, 勿冰冻。Annexin V-PE、7-AAD 需避光保存。一年有效。

注意事项

- 1) 试剂在开盖前请短暂离心, 将盖内壁上的液体甩至管底, 避免开盖时液体洒落。
- 2) 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。
- 3) 对于贴壁细胞, 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, 尽量避免人为的损伤细胞。胰酶消化时间过短, 细胞需要用力吹打才能脱落, 容易造成细胞膜的损伤, 7-AAD 摄入过多; 消化时间过长, 细胞膜同样易造成损伤, 甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-PE 的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后, 轻摇时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。在消化液中尽量不用 EDTA, EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合。

- 4) 如果样品来源于血液, 请务必除去血液中的血小板。因为血小板含有 PS, 能与 Annexin V 结合, 从而干扰实验结果。可以使用含有 EDTA 的缓冲剂并低速离心 (200×g) 洗去血小板, 然后用 Annexin V 结合缓冲液清洗细胞, 以避免残留的 EDTA 会螯合 Ca^{2+} 。
- 5) 7-AAD 为潜在致癌物, 操作时请采取防护措施, 穿防护服、戴手套等。
- 6) Annexin V-PE 和 7-AAD 是光敏物质, 在操作时请注意避光。
- 7) 本产品仅作科研用途!

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, 300g, 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 250 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞, 调节其浓度为 1×10^6 细胞/mL。
- 5) 取 100 μL 细胞悬液于 5 mL 流式管中, 加入 5 μL Annexin V/PE 和 10 μL 7-AAD, 轻轻混匀。
- 6) 避光、室温反应 15 min。
- 7) 加入 400 μL 1×Binding Buffer, 混匀, 样品在 1 小时内检测。

注: 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

A、流式细胞仪分析

- 1) 用流式细胞仪检测, Annexin V-PE 的激发波长 $Ex=488nm$; 发射波长 $Em=578 nm$, 发出橙红色荧光, 建议使用 FL2 通道检测; 7-AAD 的激发波长 $Ex=546 nm$; 发射波长 $Em=647 nm$, 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), PE 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, 活细胞仅呈很低强度的背景荧光, 早期凋亡细胞仅呈较强的橙红色荧光, 晚期凋亡细胞呈橙红和红色荧光双重染色。
- 2) 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。

B、荧光显微镜观察

- 1) 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;
- 2) 对于贴壁细胞来说, 也可直接用盖玻片来培养细胞并诱导细胞凋亡;
 - a 将细胞于盖玻片上生长, 用适当的凋亡诱导剂诱导细胞凋亡, 并设立阴性对照组;
 - b 用 PBS 洗涤细胞两次;
 - c 在 500 μL 的 Binding Buffer 中加入 1 μL Annexin V-PE, 5 μL 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。
- 3) 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。滤光片 (罗丹明) 观察 Annexin V-PE 荧光信号呈橙红色; 用激发波长 546 nm, 发射波长 647 nm, 观察 7-AAD 荧光信号呈红色。