

Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒

(Annexin V-APC/7-AAD Apoptosis Detection Kit, 100Tests)

产品编号	产品名称	包装
JX18-100T	Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒	100 次

产品简介:

Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒是用荧光素 APC 标记的 Annexin V 作为探针, 来检测细胞早期凋亡的发生, 结合 7-AAD 可区分存活的早期细胞和坏死或晚期凋亡细胞。

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。在正常活细胞中, 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 可通过细胞外侧暴露的 PS 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。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-APC 与 7-AAD 联合使用时, 7-AAD 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-APC 和 7-AAD 结合染色呈现双阳性 (Annexin V+/7-AAD+)。

包装规格 (100 Tests):

试剂编号	试剂名称	包装
JX18-100T-1	染色缓冲液 (10×)	11mL
JX18-100T-2	Annexin V-APC	500μL
JX18-100T-3	7-AAD	500μL
-----	说明书	1 份

保存方法: 本试剂盒中染色缓冲液 (10×), Annexin V-APC 在 4℃ 保存; 7-AAD 试剂-20℃ 保存。需避光保存, 一年有效。

使用说明:

本试剂盒中的染色缓冲液 (10×) 为浓缩液, 使用前用去离子水稀释成 1× 工作液。

一、仪器参数调节：

1. 收集 $1\sim 3\times 10^6$ 细胞，用预冷 PBS 离心洗涤 2 次，弃上清。
2. 加入 $300\mu\text{l}$ 的 $1\times$ Binding buffer 重悬细胞，等分成 3 管。其中一管为空白对照，两管为单染管。
3. 一个单染管加入 $5\mu\text{L}$ Annexin V-APC，另一个单染管加入 $5\mu\text{L}$ 7-AAD 染液，轻混匀后室温避光反应 15min。
4. 在流式细胞仪上，用空白对照管调节 FSC、SSC 和荧光通道电压，并在此电压条件下，用 2 个单染管调节荧光通道的补偿。

二、样品检测：

1. 收集细胞：

**悬浮细胞，用预冷 PBS， $300g$ ， 4°C 离心 5 min 收集细胞；

**贴壁细胞，用不含 EDTA 的胰酶消化后，用预冷 PBS， $300g$ ， 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。

3. 用 4°C 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每次均需 $300g$ ， 4°C 离心 5 min。调整细胞数为 $0.2\sim 1\times 10^6$ 个。
4. 细胞离心后去上清，细胞沉淀加入 $100\mu\text{l}$ 的 $1\times$ Binding buffer 悬浮细胞；
5. 同时加入 $5\mu\text{L}$ Annexin V-APC 和 $5\mu\text{L}$ 7-AAD 染液，轻混匀后室温避光反应 15min；
6. 无需洗涤，样品管加入 $400\mu\text{l}$ 的 $1\times$ Binding buffer 悬浮细胞，在 1 小时内上机检测。流式细胞仪检测，Ex/Em= $633/660\text{nm}$ 检测 Annexin V-APC 荧光建议使用 FL4 通道；Ex/Em= $546/647\text{nm}$ 检测 7-AAD 荧光建议使用 FL3 通道。

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) 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 ($200g$) 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+} 。
- 3) 推荐使用悬浮培养细胞。若是贴壁细胞，建议使用不含 EDTA 的胰酶消化，如果消化不当，可能引起假阳性；若用细胞刮子则会造成细胞黏连成团而影响检测。可将胰酶消化后的细胞保存于含 2% BSA 的 PBS 中，防止进一步的损伤。
- 4) 本试剂盒适用于检测活细胞，流式细胞仪检测时，细胞数量不应低于 2×10^5 ，不推荐用于组织样本检测。请勿固定样品，细胞固定后可能导致荧光的猝灭；
- 5) 因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同，因而流式检测的荧光补偿也不同，因此建议每次检测均需使用未经凋亡细胞处理的细胞作为阴性对照，并进行荧光补偿的调节。
- 6) Annexin V-APC 和 7-AAD 是光敏物质，在操作时请注意避光。
- 7) 7-AAD 为潜在致癌物，为了您的安全和健康，操作时请采取防护措施，穿实验服并戴一次性手套。