

Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒

Annexin V-PE/7-AAD Apoptosis Detection Kit

Cat number: KGA1015-KGA1018

Store at 2-8°C for 12 months, protected from light

For Research Use Only(科研专用)

文件编码: K220812

一、产品简介

在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞膜中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 由脂膜内侧翻向外侧。 Annexin V 是一种分子量为 35~36kD 的 Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 故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。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将 Annexin V 进行荧光素 PE 标记, 以标记了的 Annexin V 作为荧光探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。

7-AAD (7-amino-actinomycin D) 是一种核酸染料, 它不能通过正常质膜, 随着细胞凋亡、细胞死亡过程, 质膜对 7-AAD 的通透性逐渐增加, 结合细胞凋亡中 DNA 的有控降解, 在合适波长激发光的激发下可发出明亮的红色荧光, 通过 7-AAD 标记 DNA 的强弱, 将细胞分为三群: 7-AAD 强为死亡细胞, 7-AAD 弱是凋亡细胞, 7-AAD-为正常活力细胞。 7-AAD 同 PI 有着相似的荧光特性, 但其发射波谱较 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-PE 联合使用。

本试剂盒可应用于培养细胞凋亡检测 (不推荐用于检测组织样本)。

二、产品组成

| 组分 | KGA1015 | KGA1016 | KGA1017 | KGA1018 | 储存条件 |
|----------------|-----------|-----------|-----------|------------|---------|
| | 10 assays | 20 assays | 50 assays | 100 assays | |
| AnnexinV-PE | 10 μL | 20 μL | 50 μL | 100 μL | 2-8°C避光 |
| 7-AAD 染液 | 50 μL | 100 μL | 250 μL | 500 μL | 2-8°C避光 |
| Binding Buffer | 5 mL | 10.0 mL | 25 mL | 50 mL | 2-8°C |

三、试剂盒以外自备仪器和试剂

流式细胞仪、低速离心机、微量移液器 (注: 不建议使用荧光显微镜)

1.5m L Microtube、PBS、不含 EDTA 的胰酶消化液

四、注意事项

1. Annexin V-PE 组份建议按需分装冻存于-20°C, 避光保存及使用, 避免反复冻融。

2. Binding Buffer 组份不用时可放置于 4°C保存, 需要避光。

3. 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。

3. 微量试剂取用前请离心集液。

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 1×10^5 , 不推荐用于检测组织样本。

5. 推荐使用悬浮培养细胞。如果是贴壁细胞，需用不含 EDTA 的胰酶消化，如消化不当，可能引起假阳性，而用细胞刮刀会造成细胞粘连成团，而影响检测。可将胰酶消化后细胞的保存在含 2%BSA 的 PBS 中，防止进一步的损伤。

6. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭，请不要固定样品。

7. 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经凋亡诱导处理的细胞作为对照，进行荧光补偿的调节。

五、操作步骤

1. 细胞收集

1) 悬浮细胞：2000rpm，离心 5min 收集。

2) 贴壁细胞：贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集（注：胰酶消化时间不易过长，否则容易引起假阳性）；

2. 用 PBS 洗涤细胞二次（2000rpm，离心 5min）收集 $1\sim 5\times 10^5$ 细胞；

3. 加入 100 μ L 的 Binding Buffer 轻轻吹匀成单细胞悬液；

4. 加入 1 μ l Annexin V-PE 和 5 μ l 7-AAD 染液，轻轻吹匀；

5. 室温、避光、反应 5~10min；

6. 反应后再加入 400 μ L 的 Binding Buffer 混匀；

7. 请在 1 hour 内，进行流式细胞仪的观察和检测。

8. 流式细胞仪分析

1) 用流式细胞仪检测，PE 激发波长 Ex=488 nm；发射波长 Em=578 nm，橙红色荧光，建议使用 FL2 通道检测；7-AAD 激发波长 Ex=546 nm；发射波长 Em=647 nm，红色荧光，建议使用 FL3 通道检测。

2) 荧光补偿调节：使用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。

六、凯基相关产品（详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>）

细胞株、细胞提取物及细胞培养产品

细胞凋亡

细胞增殖/毒性/活力与细胞周期

细胞染色产品

亚细胞组分制备