

Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒

Annexin V-APC/7-AAD Apoptosis Detection Kit

Cat number: KGA1023-KGA1026

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

For Research Use Only(科研专用)

文件编码: K220804

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 Ca^{2+} 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 APC 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-APC 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	KGA1023	KGA1024	KGA1025	KGA1026	储存条件
	10 assays	20 assays	50 assays	100 assays	
AnnexinV-APC	50 μ L	100 μ L	250 μ L	500 μ L	2-8°C避光
7-AAD 染液	50 μ L	100 μ L	250 μ L	500 μ L	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-APC 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 500 μ L 的 Binding Buffer 轻轻吹匀成单细胞悬液；
4. 加入 5 μ l Annexin V-APC 和 5 μ l 7-AAD 染液，轻轻吹匀；
5. 室温、避光、反应 5~10min；
6. 请在 1 hour 内，进行流式细胞仪的观察和检测。
7. 流式细胞仪分析
 - 1) 用流式细胞仪检测，APC 激发波长 Ex=633 nm；发射波长 Em=660nm，红色荧光，建议使用 FL4 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