

本产品仅用于科研, 不可用于诊断

Annexin V-Alexa Fluor 647/7-AAD apoptosis kit 细胞凋亡检测试剂盒

RG100-103-100

一、产品简介

本试剂盒用于细胞凋亡的快速检测。在细胞凋亡早期, 细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 会外翻至细胞膜表面。Annexin V为胞内蛋白膜联蛋白家族成员, 以钙依赖的方式与PS结合。荧光标记的Annexin V可与PS特异性结合, 表明该细胞为凋亡细胞。

7-AAD是一种核酸染料, 它不能通过正常质膜。随着细胞凋亡或死亡的过程, 质膜对7-AAD的通透性逐渐增加。7-AAD的发射光谱较PI窄, 且发射波长更长, 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。

二、试剂盒组份

试剂盒组份	100-103-100 (100T)
Annexin V-AF647	500 μ L
7-AAD solution	500 μ L
10 \times Binding buffer	10 mL

三、步骤

(一)、样本检测

- 按实验方案诱导凋亡。
- 收集细胞:
 - 对于悬浮细胞: 在进行完细胞凋亡刺激后, 1500 rpm离心5 min, 弃上清, 收集细胞。用预冷的PBS轻轻重悬细胞, 离心沉淀细胞, 共洗涤两次。注意: PBS重悬不能省略, PBS重悬的过程同时也起到了洗涤细胞的作用, 可以保证后续Annexin V的结合。
 - 对于贴壁细胞: 小心收集细胞培养液到一离心管内备用, 用不含EDTA的胰酶消化细胞, 至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时, 加入前面收集的细胞培养液, 吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。1500 rpm左右离心5 min, 沉淀细胞。小心吸除上清, 可以残留约50 μ l左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入4 $^{\circ}$ C预冷的PBS重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清。重复洗涤步骤, 共洗涤两次。
注: a. 某些将贴壁细胞处理为单个细胞的过程中会造成细胞膜损伤, 从而造成Annexin V假阳性。
b. 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合并染色。
- 用去离子水稀释10 \times Binding buffer为1 \times 工作液, 再用1 \times Binding buffer重悬细胞, 调整细胞浓度为1-5 \times 10⁶ cells/mL。
- 吸取100 μ L细胞悬液 (细胞总数为1-5 \times 10⁵ cells) 至一新离心管中, 加入5 μ L Annexin V-AF647, 轻柔混匀; 再加入5 μ L 7-AAD solution, 轻柔混匀, 室温避光孵育10~15 min。
- 加入400 μ L 1 \times Binding buffer, 轻柔混匀。染色后样品尽量在1小时内检测。

6. 根据实验方法, 进行流式分析。Annexin V-AF647最大激发波长为651 nm, 发射波长为665 nm; 7-AAD最大激发波长为545 nm, 发射波长为650 nm。根据AF647和7-AAD荧光值确定两荧光参数阴阳界限, 划定十字门。

(二)、仪器参数调节

空白管: 阴性对照组细胞, 不加Annexin V-AF647和7-AAD。用空白管调节FSC、SSC和荧光通道的电压, 并在此电压条件下, 用单染管调节荧光通道的补偿。

单染管: 阳性对照组细胞, 单染管分别加入Annexin V-AF647或7-AAD染色, 用于调节补偿。

检测管: 处理的细胞, 加Annexin V-AF647和7-AAD, 用空白管和单染管调节好电压补偿后, 获得所需要的流式数据。

四、保存

4°C保存, Annexin V-AF647和7-AAD需避光保存; 试剂长期不用放-20°C保存; 避免反复冻融。

五、注意事项

1. Annexin V-AF647和7-AAD染色前, 不能用破坏细胞膜完整性的固定剂和穿透剂固定或透膜。
2. 使用时需戴手套。
3. Annexin V-AF647和7-AAD是光敏物质, 在操作时请注意避光。在处理和标记时, 尽可能在暗处进行。在孵育阶段, 用铝箔包裹容器或置于抽屉中。原位染色时, 在细胞标记后应在暗室内用荧光显微镜观察。
4. 尽量使用不含EDTA的胰酶, EDTA会影响Annexin V与PS的结合。
5. 如果样品来源于血液, 务必除去血小板。因血小板含有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, 在1500 rpm下离心洗去血小板。
6. 整个操作过程动作要尽量轻柔, 勿用力吹打细胞, 以免影响细胞状态。