

Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒**(Annexin V-APC/7-AAD Apoptosis Detection Kit, 20Tests)**

产品编号	产品名称	包装
JX18-20T	Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒	20 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 Ca²⁺ 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 (20 Tests):

试剂编号	试剂名称	包装
JX18-20T-1	染色缓冲液	30mL
JX18-20T-2	Annexin V-APC	100μL
JX18-20T-3	7-AAD	200μL
-----	说明书	1 份

保存方法: 本试剂盒中所有组分均在 4℃ 保存, 勿冰冻。

Annexin V-APC/7-AAD 需避光保存。一年有效。

使用说明:**一、仪器参数调节:**

1. 收集 $1\sim3\times 10^6$ 细胞, 用预冷 PBS 离心洗涤 2 次, 弃上清。
2. 加入 300μL 的 1×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 5μL Annexin V-APC, 另一个单染管加入 10μL 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:**

对于悬浮细胞, 用预冷 PBS, 300g, 4℃ 离心 5 min 收集细胞;

- 对于贴壁细胞, 用不含 EDTA 的胰酶消化后, 用预冷 PBS, 300g, 4℃ 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℃ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 每次均需 300g, 4℃ 离心 5 min。调整细胞数为 $0.2\sim1\times 10^6$ 个。

4. 细胞离心后去上清, 细胞沉淀加入 100μL 的 1×Binding buffer 悬浮细胞;

5. 同时加入 5μL Annexin V-APC 和 10μL 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 400μL 的 1×Binding buffer 悬浮细胞, 在 1 小时内上机检测。流式细胞仪检测, Ex/Em=633/660nm 检测 Annexin V-APC 荧光建议使用 FL4 通道; Ex/Em=546/647nm 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。