

Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒 (20/50/100T)

目录号: ANT004-005-006-7AAD

规格: 20 /50 /100 Tests

储存: 2-8℃避光保存, 勿冰冻。一年质保。

简介: 正常活细胞的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)只分布在质膜磷脂双分子层的内侧。当细胞开始发生早期凋亡时, 细胞膜脂质的不对称性消失, 导致PS自质膜内层翻转至外层, 从而暴露在细胞表面。Annexin V是一种36 kDa的钙依赖性的磷脂结合蛋白, 对PS有高度的亲和性。因此, 荧光标记的 Annexin V可用于检测暴露于早期凋亡细胞表面的PS。当细胞处于中晚期凋亡或发生坏死时, 由于细胞膜的破裂, Annexin V可以进入细胞内部与质膜上的PS结合。因此, 为了区分活细胞、早期凋亡细胞和中晚期凋亡细胞 (或坏死细胞), 可通过将荧光标记 Annexin V与核酸染料联合使用: 活细胞和早期凋亡细胞的细胞膜仍然完整, 核酸染料无法进入细胞内部与核酸结合, 而中晚期凋亡细胞 (或坏死细胞)由于细胞膜的破裂, 核酸染料可进入细胞内部与核酸结合, 通过流式细胞术检测细胞中 Annexin V和核酸染料的荧光强度, 可区分活细胞 (Annexin V-/核酸染料-), 早期凋亡细胞 (Annexin V+/核酸染料-)与中晚期凋亡细胞 (或坏死细胞) (Annexin V+/核酸染料+)。

组份:

	20 Tests	50 Tests	100 Tests
4X结合缓冲液 Binding Buffer (4X):	4ml	10ml	20ml
7-AAD (20µg/ml):	200µl	500µl	1ml
Annexin V-APC:	100µl	250µl	500µl

应用: Flow Cytometric Analysis

步骤: 使用本试剂盒时, 需自备1×PBS缓冲液。

1. 细胞样品的准备:**对于贴壁细胞:**

- 1) 取细胞培养瓶, 用移液器小心地吸取细胞培养液, 转移到一个干净的离心管内备用;
- 2) 用不含EDTA的胰蛋白酶消化细胞, 至细胞可以被移液器轻轻吹打下来时, 加入收集的细胞培养液, 终止消化;
- 3) 用移液器吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞;
- 4) 将细胞收集到离心管内, 1000rpm左右离心5min, 沉淀细胞(根据待测细胞特性, 可适当调整离心时间或离心力);
- 5) 用移液器小心吸除上清, 可保留约50µl左右的培养液, 避免吸走细胞;
- 6) 加入约1ml 4℃预冷的1×PBS缓冲液重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清;

对于悬浮细胞:

- 1) 将细胞收集到离心管内, 1000rpm左右离心5min, 沉淀细胞(根据待测细胞特性, 可适当调整离心时间或离心力);
- 2) 用移液器小心吸除上清, 可保留约50µl左右的培养液, 避免吸走细胞;
- 3) 加入约1ml 4℃预冷的1×PBS缓冲液重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清;

2. 根据实验用量，按1:3的比例用去离子水将4×结合缓冲液稀释成1×结合缓冲液，用于后续实验；（e.g. 若需要16ml 1×结合缓冲液，则取4ml 4×结合缓冲液+12ml去离子水）；
3. 用1×结合缓冲液重悬细胞，将细胞密度调节至 $1-5 \times 10^6/\text{ml}$ ；
4. 取100 μl 的细胞悬液于5ml流式管中，加入5 μl rh Annexin V APC，用移液器轻柔吹吸混匀，室温避光孵育5min；
5. 加入10 μl 7AAD，并加400 μl 1×PBS缓冲液，立刻进行流式检测。

注：实验过程中应注意轻柔吹吸细胞，避免造成细胞机械损伤；加入步骤5中的7AAD溶液和1×PBS缓冲液后，建议立即上机检测，若无法立即上机，应将细胞置于4℃条件下避光保存，并在1h内上机检测，避免长时间放置导致检测结果不准确。

样本分析：APC的最大激发波长是650nm，最大发射波长是668nm；7AAD-DNA复合物的最大激发波长是546nm，最大发射波长为647nm。用FlowJo等软件进行分析，绘制双色散点图（two-color dot plot），APC为横坐标，7AAD为纵坐标。典型的实验中，细胞可以分成三个亚群，活细胞仅有很低强度的背景荧光，早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光，晚期凋亡或坏死的细胞有绿色和红色荧光双重染色。

相关产品：

- ANT002 Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒（50T）
- ANT003 Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒（100T）
- ANT004 Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒（20T）
- ANT005 Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒（50T）
- ANT006 Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒（100T）
- ANT007 Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒（20T）
- ANT008 Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒（50T）