

Annexin V-PE/ 7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒

Annexin V-PE/7-AAD Apoptosis Detection Kit

说明书修订日期: 2019.11.27

Cat number: KGA1015-1018

Store at 2-8°C for 12 months, 避光

For Research Only (科研专用)

一、试剂盒说明

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 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, 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、试剂盒组份

组份	Cat: KGA1015 10 assays	Cat: KGA1016 20 assays	Cat: KGA1017 50 assays	Cat: KGA1018 100 assays	储存条件
AnnexinV-PE	10 μ L	20 μ L	50 μ L	100 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

注: 1、Annexin V-PE 组份建议按需分装小份冻存于-20°C, 避免反复冻融;

2、7-AAD 和 Binding Buffer 组份不用时可放置于 4°C 保存, 7-AAD 需要避光。

三、试剂盒以外自备仪器和试剂

流式细胞仪或荧光显微镜、低速离心机、微量移液器

1.5m L Microtube、载玻片、盖玻片 (荧光显微镜观察需用)、PBS、不含 EDTA 的胰酶消化液

四、使用注意事项

1. 微量试剂取用前请离心集液。
2. Annexin V-PE/7-AAD 避光保存及使用。
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。
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, 建议用不含 EDTA 的胰酶消化, 如消化不当, 可能引起假阳性, 而用细胞刮子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、操作方法

1. 悬浮细胞离心（2000rpm 离心 5min）收集；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. 在 50 μ L 的 Binding Buffer 中加入 5 μ L 7-AAD 染液，混匀；
4. 收集细胞中加入上述 7-AAD 染液，混匀；室温、避光、反应 5~15min；
5. 反应后再加入 450 μ L 的 Binding Buffer 混匀；
6. 加入 1 μ L Annexin V-PE 混匀；室温、避光、反应 5~15min；
7. 请在 1 小时内，进行流式细胞仪的观察和检测。

流式细胞仪分析

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

- 人类肿瘤细胞株 鼠肿瘤细胞株 正常细胞株 肿瘤耐药细胞株
- 细胞提取物（RNA/DNA/蛋白） 细胞培养相关产品

细胞凋亡

一、细胞凋亡研究试剂盒

- Annexin V-FITC/ EGFP/PE 细胞凋亡检测试剂盒
- TUNEL 凋亡原位检测系列试剂盒
- Caspase(2、3、6、8、9)系列细胞凋亡检测试剂盒
- 线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1） TRAP-PCR 端粒酶活性检测试剂盒 DNA Ladder 检测试剂盒

二、细胞凋亡相关抗体

三、凋亡诱导剂、抑制剂

四、氧化应激损伤检测试剂盒

五、细胞凋亡研究辅助试剂

细胞增殖/毒性/活力与细胞周期

凯基细胞周期检测试剂盒 MTT、XTT、WST-1、CCK-8 等系列细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒

细胞染色产品

- 活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒（AO/EB 法.荧光显微镜）
- 凯基细胞凋亡形态学检测试剂盒