

Annexin V-FITC/7-AAD细胞凋亡检测试剂盒

Annexin V-FITC/7-AAD Apoptosis Detection Kit

货号规格

货号	规格
100-105-30	30 次
100-105-60	60 次
100-105-100	100 次

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，质膜内侧的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)会外翻至细胞膜表面；而在凋亡的中后期，一些较大分子的化合物，如7-氨基放线菌素D (7-Aminoactinomycin D,7-AAD, 一种DNA结合染料)，可进入细胞将细胞核染上红色荧光。7-AAD的发射光谱较PI窄，且发射波长更长，对其它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。

Annexin V是一种Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白，能与磷脂酰丝氨酸特异性结合。本试剂盒采用绿色荧光FITC标记的Annexin V作为检测磷脂酰丝氨酸的探针，配合7-AAD，通过使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备，可以快速检测细胞凋亡。因此将Annexin V-FITC与7-AAD进行共染，就可以区分不同凋亡时期的细胞。在双色流式细胞仪散点图上，Annexin V-FITC与7-AAD双阴性为正常细胞，Annexin V-FITC阳性、7-AAD阴性为早期凋亡细胞，Annexin V-FITC与7-AAD双阳性为晚期凋亡细胞或坏死细胞。

产品组分

组分名称	100-105-30	100-105-60	100-105-100
Annexin V-FITC	150 μ L	300 μ L	500 μ L
7-AAD Solution	150 μ L	300 μ L	500 μ L
10 $\times$ Binding Buffer	3 mL	6 mL	10 mL

保存条件

本产品冰袋运输；避光保存于2~8℃，保质期12个月。Annexin V-FITC和7-AAD Solution需避光保存。

注意事项

- Annexin V-FITC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穿膜。
- 整个操作过程动作要尽量轻柔，请勿用力吹打细胞，避免对细胞造成机械性损伤。
- 对于贴壁细胞，消化过程需注意：
 - 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；
 - 胰酶消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，导致7-AAD摄入过多；消化时间过长，细胞膜同样易造成损伤，甚至会影响细胞膜上PS与Annexin V-FITC的结合。
 - 尽量使用不含EDTA的胰酶，EDTA会影响Annexin V与PS的结合；如使用含EDTA的胰酶消化细胞，需要在染色之前用PBS洗涤细胞两次以去除EDTA。
- 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的缓冲剂并在1500 rpm(200 $\times$ g)离心洗去血小板。
- Annexin V-FITC和7-AAD是光敏物质，在操作时请注意避光。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

检测方法

(一) 样本染色-悬浮细胞

1. 离心收集所需细胞(1500 rpm,5min);
2. 加入预冷的PBS轻柔重悬细胞，离心收集细胞，共洗涤两次;
3. 用去离子水将10×Binding Buffer稀释至1×Binding Buffer，再用1×Binding Buffer重悬细胞，调整细胞浓度为 $1-5 \times 10^6$ cells/mL;

▲流式检测需设置三个对照样品来调节电压和补偿:

空白管: 仅用1×Binding Buffer重悬的细胞，以评估自身荧光水平，并调整仪器电压;

单染管: 分别用Annexin V-FITC或7-AAD染色，用于调节荧光通道的补偿。

4. 吸取100 μ L细胞悬液(细胞总数为 $1-5 \times 10^5$ cells)至一新EP管中，加入5 μ L Annexin V-FITC，轻柔混匀;再加入5 μ L 7-AAD，轻柔混匀，室温避光孵育10~15 min;
5. 加入400 μ L 1×Binding Buffer，轻柔混匀。染色后样品尽量在1 h内用流式细胞仪检测。

(一) 样本染色-贴壁细胞

1. 将细胞培养液吸出至一新离心管内，接着用预冷的PBS轻柔洗涤贴壁细胞一次。加入可以覆盖贴壁细胞的胰酶消化液，轻摇使胰酶与细胞充分接触，室温消化适当时间，轻轻吹打可以使贴壁细胞脱落下来即可;
2. 在细胞中加入上一步骤收集的细胞培养液，稍混匀，转移至离心管内，离心(1500 rpm,5min)，弃上清，收集细胞;
3. 加入预冷的PBS 轻柔重悬细胞，离心收集细胞，共洗涤两次;
4. 用去离子水将10×Binding Buffer稀释至1×Binding Buffer，再用1×Binding Buffer重悬细胞，调整细胞浓度为 $1-5 \times 10^6$ cells/mL;

▲流式检测需设置三个对照样品来调节电压和补偿:

空白管: 仅用1×Binding Buffer重悬的细胞，以评估自身荧光水平，并调整仪器电压;

单染管: 分别用Annexin V-FITC或7-AAD染色，用于调节荧光通道的补偿。

5. 吸取100 μ L细胞悬液(细胞总数为 $1-5 \times 10^5$ cells)至一新EP管中，加入5 μ L Annexin V-FITC，轻柔混匀;再加入5 μ L 7-AAD，轻柔混匀，室温避光孵育10~15 min;
6. 加入400 μ L 1×Binding Buffer，轻柔混匀。染色后样品尽量在1 h内用流式细胞仪检测。

样品分析

1. 流式细胞仪分析

FITC 使用 FL1 通道 (Ex/Em=490/525 nm) 的流式细胞仪分析细胞; 7-AAD 最大激发波长为 545 nm, 最大发射波长为 650 nm, 可用流式细胞仪 FL3 通道或配备 650 nm 长通滤光片的荧光显微镜检测远红荧光。

2. 荧光显微镜分析

滴一滴染色后的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞，荧光显微镜下观察。在荧光显微镜下用双色滤光片观察: Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色，7-AAD 荧光信号呈红色。

▲对于贴壁细胞，可直接用盖玻片培养细胞并诱导细胞。

常见问题与解决方案

1. 假阳性

未经凋亡诱导的细胞(阴性对照)染色后Annexin V-FITC/7-AAD双阳性比例过高，其原因可能是细胞本身活力低，建议用台盼蓝染色计算细胞活力，阴性对照组台盼蓝阳性的细胞比例应小于5%。若细胞活力低，建议换用其他细胞或重新复苏细胞，新复苏的细胞应传代1-2代以后进行实验。

2. Annexin V-FITC染色失败或者阳性率偏低。

首先需要确定实验中所用的凋亡诱导剂是否能产生凋亡。可通过设立阳性对照组来确定(诱导效果确定的阳性药物处理细胞)。Annexin V-FITC染色失败，最常见的操作原因是贴壁细胞消化不当。Annexin V跟PS的结合需要 Ca^{2+} ，Binding Buffer中含有 Ca^{2+} ，含EDTA的胰酶消化会影响染色。