

Annexin V-EGFP/7-AAD 凋亡检测试剂盒

货号: K070

规格: 20T/50T/100T

试剂盒组份:

Reagents	20T	50T	100T
Annexin V-EGFP	100 μ L	250 μ L	500 μ L
1X Binding Buffer	10mL	25mL	50mL
7-AAD	100 μ L	250 μ L	500 μ L

保存条件:

2-8°C 保存一年。Annexin V-EGFP 和 7-AAD 试剂要避光保存，禁止冷冻保存。

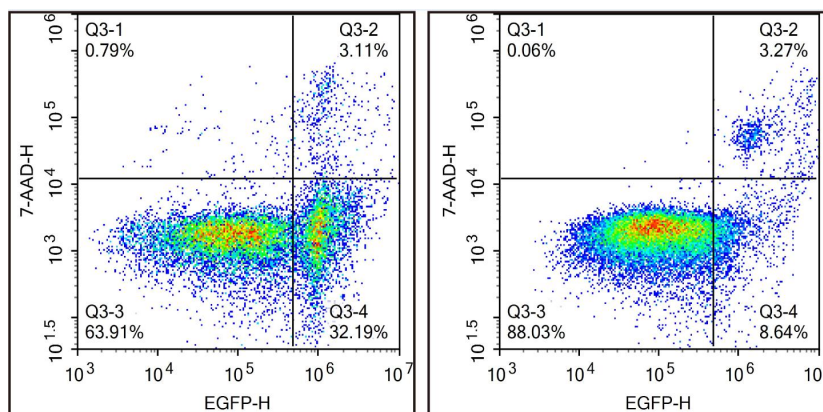
运输条件: 冰袋

实验原理:

Annexin V-EGFP/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒可检测悬浮细胞和贴壁细胞的凋亡情况。

Annexin V 是一种钙依赖性磷脂酰丝氨酸结合蛋白，对磷脂酰丝氨酸 PS 具有高亲和力，Annexin V-EGFP 可以通过暴露在细胞外的 PS 与早期凋亡细胞的细胞膜结合。细胞凋亡可通过流式细胞术或荧光显微镜检测。

7-氨基放线菌素 D(7-AAD)可与双链 DNA 特异性结合，产生强烈的荧光，通常无法穿透细胞膜，由于凋亡晚期或坏死细胞膜完整性丧失，7-AAD 可进入细胞染色 DNA，与 Annexin V 联合使用，可区分处于不同凋亡阶段的细胞。下图为本试剂盒检测喜树碱诱导 Jurkat 细胞凋亡的效果：



Jurkat 细胞用 5 μ M 喜树碱处理(左)或未处理(右)4 小时。用本试剂盒染色后，流式细胞术进行荧光检测。Annexin V-EGFP 单阳性细胞为早期凋亡细胞，Annexin V-EGFP 和 7-AAD 双阳性细胞为坏死或晚期凋亡细胞，7-AAD 单阳性细胞为裸核细胞。

实验步骤:

A. Annexin V-EGFP 与细胞孵育

1. 按照实验方案诱导细胞凋亡。300 g 离心 5 分钟，丢弃上清，收集细胞，用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。
2. 离心收集 $1-5 \times 10^5$ 个细胞，丢弃上清。PBS 洗涤细胞 1 次，离心后弃上清。
3. 用 500 μ l 1X Binding Buffer 重悬细胞。
4. 加入 5 μ l Annexin V-EGFP 和 5 μ l 7-AAD。
5. 轻轻涡旋混匀，室温避光孵育 15 分钟。
6. 立即检测，如果不能及时检测，请放冰上避光静置并在 1 小时内完成检测。

B. 流式细胞术定量

流式细胞术分析 Annexin V-EGFP 结合 (Ex = 488 nm; Em = 530 nm)，采用 EGFP 信号检测器 (通常为 FL1)，采用 PerCP (通常为 FL3 通道) 进行 7-AAD 检测。

对于贴壁细胞，首先收集细胞培养液，PBS 洗涤细胞一次后用胰酶消化细胞，然后加入收集的细胞培养液，把细胞轻轻吹下来，离心弃上清，细胞用 PBS 重悬并计数，之后进行步骤 A. 2-5。

C. 荧光显微镜检测

将步骤 A. 5 中的细胞悬液涂布在载玻片上。用盖玻片盖住细胞。

如果分析贴壁细胞，直接在细胞爬片上培养细胞。孵育后 (A. 5)，将细胞爬片倒置在玻片上，观察细胞。

注意事项:

1. 染色后应尽快检测。时间过长可能导致凋亡或坏死细胞数量增加。
2. 检测贴壁细胞时，应收集诱导凋亡后产生的悬浮细胞与随后收集的贴壁细胞一起检测。
3. 尽量避免消化贴壁细胞造成的机械损伤。同时，胰酶的消化液应尽可能不含 EDTA，因为 EDTA 影响 Annexin V 与磷脂酰丝氨酸的结合。
4. 如果使用含有 EDTA 的胰酶，收集后应彻底清洗细胞，以确保 EDTA 被去除。
5. 荧光物质容易猝灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和储存过程中也要尽量注意保光。
6. 为了您的安全和健康，请穿上实验服，戴上一次性手套。
7. 本产品仅供科学研究使用。