

Annexin V-FineTest®488/7-AAD 凋亡检测试剂盒

货号: K075

规格: 20T/50T/100T

试剂盒组份:

Reagents	20T	50T	100T
Annexin V-FineTest®488	100μL	250μL	500μL
1X Binding Buffer	10mL	25mL	50mL
7-AAD	100μL	250μL	500μL

保存条件:

2-8°C 保存一年。Annexin V-FineTest®488 和 7-AAD 试剂要避光保存，禁止冷冻保存

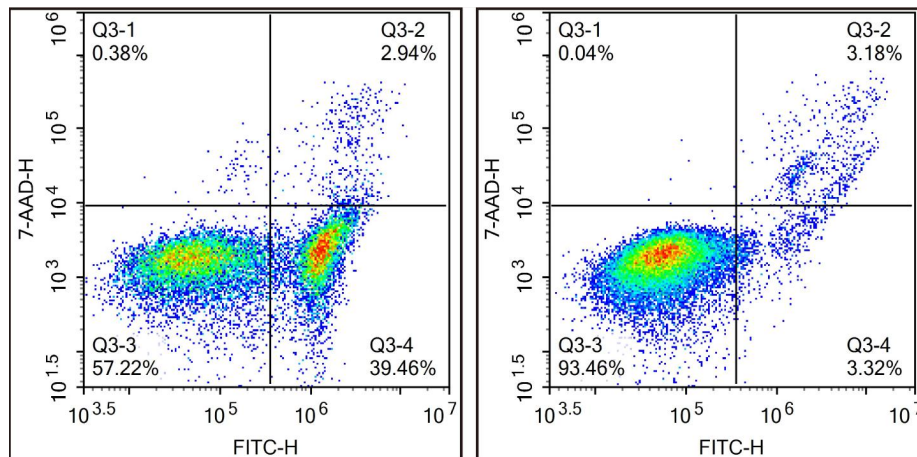
运输条件: 冰袋

实验原理:

Annexin V-FineTest®488/7-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-FineTest®488 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-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，由于晚期凋亡或坏死的细胞膜完整性丧失，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-FineTest®488 单阳性细胞为早期凋亡细胞, Annexin V-FineTest®488 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-FineTest®488 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-FineTest®488 和 5 μ l Pro7-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-FineTest®488, 采用 FITC 信号检测器, 7-AAD 检测优先选择 PerCP/Cy5.5 通道。

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, 戴上一一次性手套。
7. 本产品仅供科学研究使用。