

Annexin V-Alexa Fluor 647/7-AAD 凋亡检测试剂盒

Catalog No.	Size
FXP147-020	20 Tests
FXP147-050	50 Tests
FXP147-100	100 Tests

检测原理:

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而核酸结合, 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+)。

储存条件:

2-8℃避光保存, 勿冰冻。

有效期:

一年。

注意事项:

本试剂盒需使用流式细胞仪进行检测。

此产品仅供研究, 不用于临床诊断。

试剂盒组份:

组分	浓度	20 Tests	50 Tests	100 Tests
4×结合缓冲液 (Binding Buffer 4x)	/	4ml	10ml	20ml
7-AAD Viability Staining Solution	20ug/ml	0.2ml	0.5ml	1.0ml
重组人Annexin V Alexa Fluor 647 (rh Annexin V Alexa Fluor 647)	/	0.1ml	0.25ml	0.5ml

操作步骤:

使用本试剂盒时, 需自备1×PBS缓冲液。

1. 细胞样品的准备:

4A Biotech Co., Ltd.

Add: No.Room 201, building 17, No. 8, Jinfeng Road, science and Technology City, Gaoxin District, Suzhou
Website: www.4abio.net Toll Free (China only): 400-7060-959 Technical support: tech@4abio.com

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100μl的细胞悬液于5ml流式管中, 加入5μl rh Annexin V Alexa Fluor 647, 用移液器轻柔吹吸混匀, 室温避光孵育5min;
5. 加入10μl 7-AAD, 并加400μl 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7-AAD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。

实验设计:

1) 未转染GFP细胞:

流式管设置	待测细胞	样本要求	rh Annexin V Alexa Fluor 647	7-AAD	用途
空白管	100ul	凋亡细胞+活细胞	-	-	流式细胞仪参数调节
7-ADD 单染管	100ul	凋亡细胞+活细胞	-	10ul	电压及荧光补偿调节
Annexin V 单染管	100ul	凋亡细胞+活细胞	5ul	-	电压及荧光补偿调节
检测管	100ul	依据实验设计处理	5ul	10ul	正式检测

注: 为保证仪器参数及荧光补偿的正确调节, 空白管和单染管中的待测细胞应同时包括凋亡细胞和正常细胞。若无法确认待测细胞的凋亡程度, 可通过热刺激诱导或凋亡诱导剂诱导凋亡后再用于空白管和单染管的检测。

2) 转染GFP细胞:

流式管设置	待测细胞	GFP	样本要求	rh Annexin V Alexa Fluor 647	7-AAD	用途
未转染 GFP 空白管	100ul	未转染	凋亡细胞+活细胞	-	-	流式细胞仪参数调节
转染 GFP 空白管	100ul	转染	凋亡细胞+活细胞	-	-	电压及荧光补偿调节
7-ADD 单染管	100ul	转染	凋亡细胞+活细胞	-	10ul	电压及荧光补偿调节
Annexin V 单染管	100ul	转染	凋亡细胞+活细胞	5ul	-	电压及荧光补偿调节
检测管	100ul	转染	依据实验设计处理	5ul	10ul	正式检测

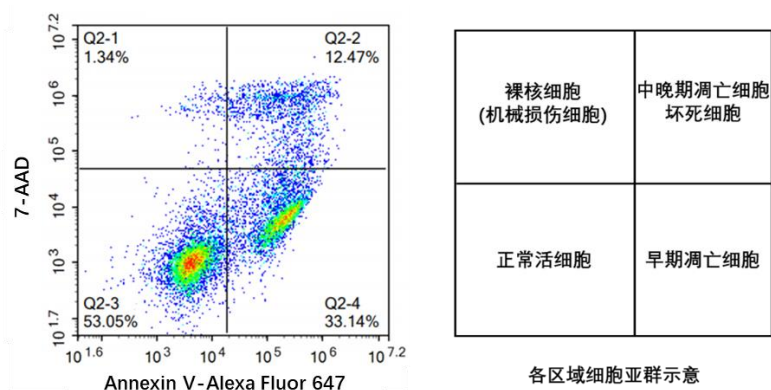
注: 为保证仪器参数及荧光补偿的正确调节, 空白管和单染管中的待测细胞应同时包括凋亡细胞和正常细胞。若无法确认待测细胞的凋亡程度, 可通过热刺激诱导或凋亡诱导剂诱导凋亡后再用于空白管和单染管的检测。

4A Biotech Co., Ltd.

Add: No.Room 201, building 17, No. 8, Jinfeng Road, science and Technology City, Gaoxin District, Suzhou
Website: www.4abio.net Toll Free (China only): 400-7060-959 Technical support: tech@4abio.com

样本分析:

Alexa Fluor 647 的最大激发波长是 650nm, 最大发射波长是 668nm, 7-AAD-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), Alexa Fluor 647 为横坐标, 7-AAD 为纵坐标。典型的实验中, 细胞可以分成三个亚群, 活细胞为 Alexa Fluor 647 和 7-AAD 双阴性群, 早期凋亡细胞为 Alexa Fluor 647 阳性且 7-AAD 阴性群, 晚期凋亡或坏死的细胞为 Alexa Fluor 647 和 7-AAD 双阳性群。



Jurkat 细胞经喜树碱诱导凋亡后用 Annexin V Alexa Fluor 647/PI 双染流式分析图谱

常见问题:

1、 Annexin V/ 7-AAD 凋亡检测的试剂盒能否检测人以外其他动物的细胞凋亡情况?

可以。因为 Annexin V 是与磷脂酰丝氨酸(PS)亲和, 而 PS 在不同种属间没差异。在正常细胞中, PS 只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, PS 由脂膜内侧翻向外侧。

2、 贴壁细胞做凋亡用胰酶消化下来对细胞膜损伤?

低浓度胰酶消化, 轻柔吹打贴壁细胞 2~3 次, 离心机 4°C 1000rpm 离心 5min, 处理得当的话, 胰酶造成损伤可以控制在 5%以内, 有对照组的情况下对实验结果不会造成明显影响。

3、 贴壁细胞可以先染 7-AAD 然后再消化下来吗? 这样是否可以减小由于消化液造成的细胞膜破损而染上的 7-AAD 的误差?

先染 7-AAD 可能会导致两个问题: 1、不易判断每组 7-AAD 是否染色均匀, 2、7-AAD 对细胞有毒性, 对实验结果影响比胰酶消化更大。因此不建议先染 7-AAD。

4、 为什么只能用不含 EDTA 的胰酶消化贴壁细胞, 用含 EDTA 的胰酶消化细胞对结果有什么影响?

因为 Annexin V 是 Ca 依赖的蛋白, 若加入 EDTA, EDTA 会螯合 Ca²⁺离子, 从而影响 Annexin V 与 PS 的结合, 进而影响结果。

5、 有些厂家说明书 Annexin V 和 7-AAD 一起加? 为什么你们先加 Annexin V 后加 7-AAD?

用流式检测凋亡时, 7-AAD 受时间的影响很大, 因标记了 7-AAD 后会加大细胞毒性, 随着时间延长会导致 7-AAD 的染色增加, 特别是检测早期凋亡时, 如果时间延长除了会导致在流式细胞仪上的细胞分群差距加大外, 误差会明显加大。一般 7-AAD 加上后立刻上机, 在一个小时内检测完成。两种方法都可以, 但是按照我们操作步骤造成的误差会更小。

6、 你们哪种凋亡检测试剂盒能用于转染 GFP 细胞的凋亡检测?

FXP147 Annexin V-Alexa Fluor 647/7AAD 凋亡检测试剂盒

FXP023 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 凋亡检测试剂盒

4A Biotech Co., Ltd.

Add: No. Room 201, building 17, No. 8, Jinfeng Road, science and Technology City, Gaoxin District, Suzhou
Website: www.4abio.net Toll Free (China only): 400-7060-959 Technical support: tech@4abio.com

相关产品

Catalog No.	Product Name	Applications
FXP018	AnnexinV-FITC/7-AAD 凋亡检测试剂盒	FC
FXP022	AnnexinV-Alexa Fluor488/PI 凋亡检测试剂盒	FC
FXP023	AnnexinV-Alexa Fluor647/PI 凋亡检测试剂盒	FC
FXP025	AnnexinV-eGFP/PI 凋亡检测试剂盒	FC
FXP027	Annexin V-PE/7-AAD 凋亡检测试剂盒	FC
FXP145	AnnexinV-FITC/7-AAD 凋亡检测试剂盒	FC
FXP146	AnnexinV-Alexa Fluor 488/7-AAD 凋亡检测试剂盒	FC
FXP127	Camptothecin(5mM)	细胞凋亡诱导剂
FXP128	Cisplatin(10mM)	细胞凋亡诱导剂
FXP129	CCCP (50mM)	细胞凋亡诱导剂
FXP130	Cycloheximide(10mM)	细胞凋亡诱导剂
FXP131	Etoposide(10mM)	细胞凋亡诱导剂

4A Biotech Co., Ltd.

Add: No.Room 201, building 17, No. 8, Jinfeng Road, science and Technology City, Gaoxin District, Suzhou
 Website: www.4abio.net Toll Free (China only): 400-7060-959 Technical support: tech@4abio.com