

Annexin V-FITC/7-AAD Apoptosis Detection Kit

Cat# CA0104

产品概述

Annexin V-FITC / 7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒是用 FITC 标记的重组人 Annexin V 来检测细胞凋亡时出现在细胞膜表面的磷脂酰丝氨酸 (PS) 的一种细胞凋亡检测试剂盒。可以使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备进行检测。Annexin 是一类广泛分布于真核细胞细胞浆内钙离子依赖的磷脂结合蛋白，参与细胞内的信号转导。Annexin V 选择性结合磷脂酰丝氨酸。磷脂酰丝氨酸主要分布在细胞膜内侧，即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期，不同类型的细胞都会把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面，即细胞膜外侧。磷脂酰丝氨酸暴露到细胞表面后会促进凝血和炎症反应。而 Annexin V 和外翻到细胞表面的磷脂酰丝氨酸结合后可以阻断磷脂酰丝氨酸的促凝血和促炎症反应活性。用带有绿色荧光的探针 FITC 标记 Annexin V，即 Annexin V-FITC，就可以用流式细胞仪或荧光显微镜直接检测到磷脂酰丝氨酸外翻这一细胞凋亡的重要特征。

7-AAD，英文全称为 7-aminoactinomycin D，中文名称为 7-氨基放线菌素 D，是一种能够嵌入核酸的荧光指示剂，形成的 DNA 复合物在 546 nm 激发光下产生 647 nm 的最大发射光。7-AAD 和碘化丙啶 (PI) 类似，是一种非细胞膜渗透性的荧光染料，不能穿过具有生物活性的细胞质膜，因此被用来区分正常细胞与坏死细胞，也可以用于细胞固定或通透后的核酸染色。与 PI 不同的是，7-AAD 被 546 nm 的氩离子激光激发后，其发射光谱较 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。7-AAD 在光谱的 600 nm 左右有较弱荧光，可用一般的荧光显微镜检测红色荧光，而在远红光 650 nm 左右有较强荧光，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外荧光。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 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，7-AAD 为晚期凋亡细胞或坏死细胞。

产品/组分信息

组分编码	产品组成	CA0104-10T	CA0104-100T
CA0104-10T/50T/100T-1	Annexin V-FITC	50 μL	500 μL
CA0104-10T/50T/100T-2	7-AAD	100 μL	1 mL
CA0104-10T/50T/100T-3	Binding Buffer (10×)	5 mL	50 mL

储存方式

2-8℃ 保存；Annexin V-FITC、7-AAD 需避光保存，不可冷冻。

使用说明

注意事项

- 开盖前，请将试剂管短暂离心，将盖内壁上的试剂离心至管底，避免开盖时液体洒落。
- 如果有细菌或真菌污染，会严重影响检测效果。
- 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。

4. 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。

5. 本产品仅作科研用途!

样品染色

1. 将 Binding Buffer (10×) 稀释成 1×Binding Buffer 工作液备用 (1 mL Binding Buffer (10×) 需加入 9 mL 无菌去离子水)。

2. 对于悬浮细胞，500-1000 g 离心 5 min 收集细胞。

对于贴壁细胞，要用不含 EDTA 的胰酶消化细胞，胰酶消化时间不宜过长或过短，最好是在轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时，加入细胞培养液，将细胞轻轻吹打下来，转移到离心管内，500-1000 g 离心 5 min 收集细胞。

【注】：

1. 对于贴壁细胞，胰酶消化步骤很关键。胰酶消化时间如果过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，从而导致细胞坏死的假阳性；消化时间如果过长，同样易造成细胞膜损伤而出现细胞坏死的假阳性，甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-FITC 的结合从而干扰对于细胞凋亡的检测。

2. 在消化液中尽量不用 EDTA，EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 结合。

3. 如果细胞收集过程中使用了胰酶，需去除残留胰酶。残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-FITC，导致染色失败。

4. 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 200 g 离心洗去血小板。

3. 收集细胞后，加入预冷 PBS 溶液轻摇或用移液器轻柔吹打洗涤，离心收集细胞，共洗涤 2 次。

【注】：请尽量将上清弃净，以免 PBS 残留影响实验结果。

4. 在细胞沉淀中加入 1×Binding Buffer 工作液，重悬细胞，使细胞密度达到 1×10^6 cell/mL。

5. 吸取 100 μ L 细胞悬液 (细胞总数为 1×10^5 cell) 至一新管中，加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5-10 μ L 7-AAD，轻轻混匀，室温避光孵育 15 min。

样品检测

流式细胞仪检测

染色孵育后，每管加入 400 μ L 1×Binding Buffer 工作液，混匀后使用流式细胞仪检测。

【注】：由于细胞凋亡是一个快速的过程，建议样品在染色后 1 小时之内进行分析。

建议设置正常细胞、7-AAD 单染和 Annexin V-FITC 单染 3 个对照组，正常细胞组可作为荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。若十字门的位置不易设定，可采用经凋亡诱导的细胞进行设定。FITC 最大激发波长为 488 nm，最大发射波长 525 nm，FITC 的绿色荧光在 FL1 通道检测；7-AAD-DNA 复合物的最大激发波长为 546 nm，最大发射波长为 647 nm，7-AAD 的红色荧光在 FL3 通道检测。结果可用 CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图 (two-color dot plot)，FITC 为横坐标，7-AAD 为纵坐标。Annexin V-FITC 和 7-AAD 联合使用时，活细胞仅有很低强度的背景荧光，早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光，晚期凋亡细胞有绿色和红色双重荧光。

荧光显微镜检测

染色孵育后涂片，显微镜下观察。使用荧光显微镜上的蓝光和绿光通道分别观察 FITC 和 PI。被 Annexin V-FITC 结合的细胞显示浆膜上有绿色荧光。丧失细胞膜完整性的细胞，细胞核显示红色，膜上有绿色荧光。

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

CYTOCH