

M5 Hiper Annexin V-PE/7-AAD

凋亡检测试剂盒说明书

产品名称	单位	货号
M5 Hiper Annexin V-PE/7-AAD kit	50T	MF126-01

【储存条件】

4°C 避光保存

【产品概述】

Annexin V-PE/7-AAD流式检测试剂盒是一种采用Annexin-PE与7-AAD双染法进行细胞早期凋亡分析的检测试剂盒。

细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面，这些细胞膜表面的改变之一是磷脂酰丝氨酸（PS）从细胞膜内转移到细胞膜外，使 PS 暴露在细胞膜外表面。PS 是一种带负电荷的磷脂，正常主要存在于细胞膜的内面，在细胞发生凋亡时细胞膜上的这种磷脂分布的不对称性被破坏而使 PS 暴露在细胞膜外。Annexin V 具有易于结合到磷脂类如PS 的特性，对 PS 有高度的亲和性。因此，该蛋白可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS。PS 转移到细胞膜外不是凋亡所独特的，也可发生在细胞坏死中。两种细胞死亡方式间的差别是在凋亡的初始阶段细胞膜是完好的，而细胞坏死在其早期阶段细胞膜的完整性就被破坏。7-AAD（7-amino-actinomycin D）是一种核酸染料，可进入死细胞内与DNA结合，能够对坏死和凋亡晚期的细胞进行染色。7-ADD与PI 有着相似的荧光特性，但其发射光谱较PI 窄，对其他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，因此通常将Annexin V-PE与ADD配合染色，以区别凋亡早期细胞与坏死细胞和凋亡的晚期细胞。

【产品组分】

	50 T
4x Binding Buffer	10 ml
7-AAD Viability Staining Solution	500 µl
Annexin V-PE	250 µl

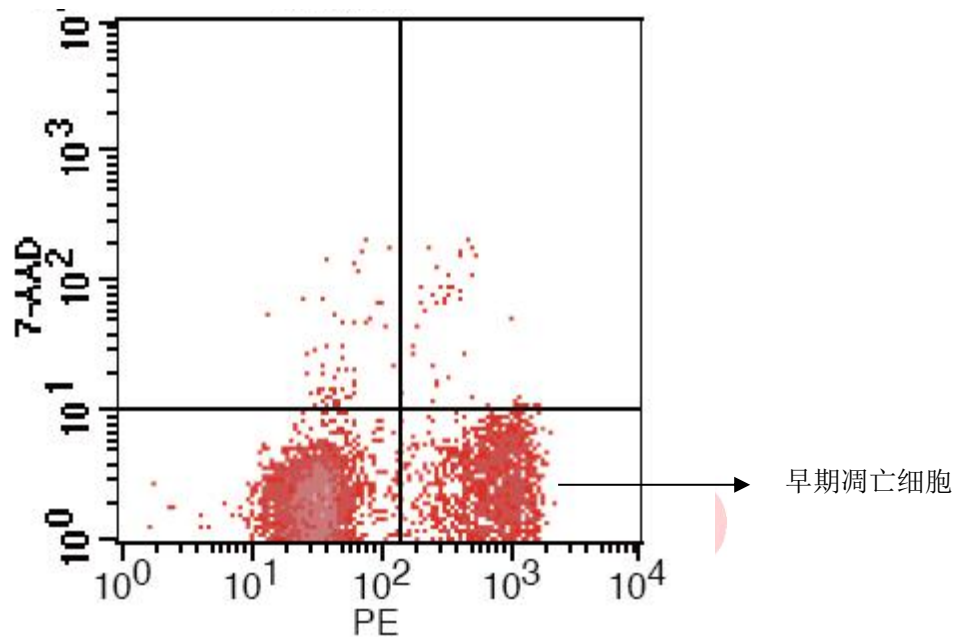
【注意事项】

1. 消化细胞时不能用含EDTA的胰酶。
2. 本试剂盒需使用流式细胞仪进行检测。
3. 需自备PBS和去离子水。
4. 荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
5. 请穿实验服并戴一次性手套操作。

【操作步骤】

1. 细胞样品的准备：
 - a. 对于贴壁细胞：小心收集细胞培养液到一离心管内备用。用胰酶消化细胞，至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时，加入前面收集的细胞培养液，吹打下所有的贴壁细胞，并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。1000×g左右离心3-5分钟，沉淀细胞。对于特定的细胞，如果细胞沉淀不充分，可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清，可以残留约50 µl左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约1 ml 4°C预冷的PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清。再次加入1 ml 4°C预冷的PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞。
 - b. 对于悬浮细胞：1000×g左右离心3-5分钟，沉淀细胞。对于特定的细胞，如果细胞沉淀不充分，可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清，可以残留约50 µl左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约1 ml 4°C预冷的PBS，重悬细胞，并转移到1.5 ml离心管内。再次离心沉淀细胞，小心吸除上清，可以残留约50 µl左右的PBS，以避免吸走细胞。再次加入1 ml 4°C预冷的PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞。

2. 用去离子水按 1:3 稀释 Binding Buffer (4 ml Binding Buffer+12 ml 去离子水)。
3. 用 250 μl Binding Buffer 重新悬浮细胞, 调节其浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。
4. 取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中, 加入 5 μl Annexin V-PE 和 10 μl 7-AAD 溶液。
5. 混匀后于室温避光孵育 15 分钟。
6. 在反应管中加 400 μl PBS, 流式细胞仪 (FACS) 分析。

【实验图例】

Jurkat 细胞用顺铂诱导凋亡后用 Annexin V-PE/7AAD 双染流式分析图谱

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。