



Annexin V-APC/7-AAD双染细胞凋亡检测试剂盒

简介:

在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸(PS)只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞膜中的磷脂酰丝氨酸(PS)由脂膜内侧翻向外侧。

Annexin V 是一种分子量为 35-36 kD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。

因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将 Annexin V 进行荧光素 APC 标记, 以标记了的 Annexin V 作为荧光探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。7-AAD (7-amino-actinomycin D) 是一种核酸染料, 它不能通过正常质膜, 随着细胞凋亡、细胞死亡过程, 质膜对 7-AAD 的通透性逐渐增加, 结合细胞凋亡中 DNA 的有控降解, 在合适波长激发光的激发下可发出明亮的红色荧光, 通过 7-AAD 标记 DNA 的强弱, 将细胞分为三群: 7-AAD 强为死亡细胞, 7-AAD 弱是凋亡细胞, 7-AAD 阴性为正常活力细胞。7-AAD 同 PI 有着相似的荧光特性, 但其发射波谱较 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, 可与 Annexin V-APC 联合使用。本试剂盒可应用于培养细胞的凋亡检测(不推荐用于检测组织样本)。

组成:

组分	R41147-10	R41147-20	R41147-50	R41147-100	储存条件
	10 tests	20 tests	50 tests	100 tests	
Annexin V-APC	50 μL	100 μL	250 μL	500 μL	2-8°C, 避光
7-AAD染液	50 μL	100 μL	250 μL	500 μL	2-8°C, 避光
Binding Buffer	5mL	10 mL	25mL	50 mL	2-8°C

试剂盒以外自备仪器和试剂



1.5 mL Microtube

PBS

不含 EDTA 的胰酶消化液

流式细胞仪、荧光显微镜、低速离心机、微量移液器

操作步骤(仅供参考):

对于流式操作检测

1. 细胞收集

- a. 悬浮细胞: 300× g 离心力, 离心 5 min 收集;
- b. 贴壁细胞: 贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集(注: 胰酶消化时间不宜过长, 否则容易引起假阳性);

2. 用 PBS 洗涤细胞 2 次(300× g, 离心 5 min)收集 $1-5 \times 10^5$ 个细胞;

3. 加入 500 μ L 的 Binding Buffer 轻轻吹匀成单细胞悬液;

4. 加入 5 μ L Annexin V-APC 和 5 μ L 7-AAD, 轻轻混匀;

5. 室温、避光条件下, 反应 5-10 min;

6. 请在 1 h 内, 进行流式细胞仪的观察和检测。

7. 流式细胞仪分析

a. 用流式细胞仪检测, Annexin V-APC (Ex=633 nm, Em=660 nm) 的荧光通道 (FL4) 检测; 7-AAD 激发波长 Ex=546 nm; n 发射波长 Em=647 nm, 建议使用 FL3 通道检测。

b. 荧光补偿调节: 使用经诱导处理的凋亡细胞, 作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

对于荧光显微镜检测

1. 选择 24 孔板或 48 孔板进行细胞培养和处理;

2. 染色前, 使用多孔板离心机 300× g, 离心 5 min;

3. 去除细胞培养液, 加入 PBS 洗涤 1 次;

4. 根据样本数量, 计算并配制染色工作液: 在 1.5 mL EP 管中, 加 500 μ L Binding Buffer、5 μ L Annexin V-APC 和 5 μ L 7-AAD, 混匀(以 500 μ L 为例);



5. 将染色工作液加入孔板中（12 孔板每孔加 500 μL 、24 孔板每孔加 200 μL 、96 孔板每孔加 100 μL ），室温避光孵育 20 min;

6. 即刻在荧光显微镜下观察。

注意事项:

1. 微量试剂取用前请离心集液。
2. Annexin V-APC, 7-AAD 避光保存及使用。
3. 7-AAD 有毒, 操作时请戴手套。
4. 本试剂盒适用于检测活细胞, 流式细胞仪检测时, 细胞数量不应低于 1×10^5 个/mL, 不推荐用于检测组织样本。
5. 贴壁细胞, 需用不含 EDTA 的胰酶消化, 如消化不当, 可能引起假阳性, 而用细胞刮刀会造成细胞粘连成团, 影响检测。可将胰酶消化后细胞的保存在含有 2% (w/v) BSA 的 PBS 中, 防止进一步的损伤。
6. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭, 请不要固定样品。
7. 因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同、设置参数也不同, 建议每次检测均需使用经凋亡诱导处理的细胞作为对照, 进行荧光补偿的调节。

实验范例:

1. 流式检测

使用 DDP (20 μM) 诱导人慢性髓系白血病 K562 细胞 48 h, 300 $\times$ g 离心 5 min, 收集细胞, 参照说明书的操作方法进行检测, 经流式细胞仪检测结果见图 1。

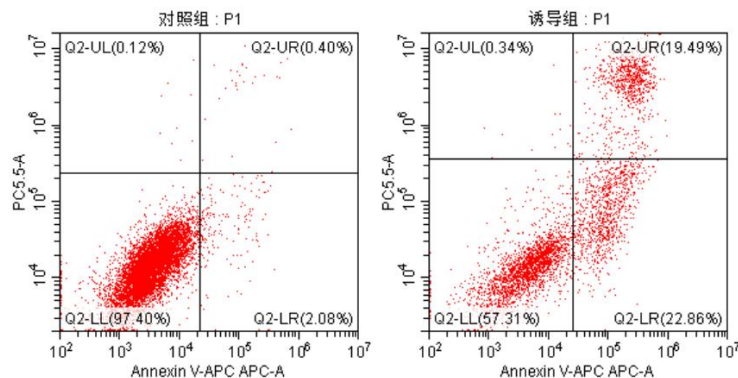


图 1. K562 细胞用本试剂盒染色后流式细胞仪检测细胞凋亡的效果图。K562 细胞未经处理或 DDP (20 μ M) 作用 48h 后, 用本试剂盒染色, 然后用流式细胞仪进行细胞的凋亡检测; (左) 未诱导凋亡的对照组; (右) 顺铂 DDP 诱导组。从图中可以看出, 与对照组相比, K562 细胞经过 DDP (20 μ M) 处理后, 其 Annexin V-APC 染色阳性/7-AAD 染色阴性的细胞 (早期凋亡细胞), 明显增加(右下象限), Annexin V-APC 和 7-AAD 染色双阳性的细胞 (晚期细胞), 也有所增加(右上象限)。

2. 荧光显微镜检测

使用 DDP (10 μ M) 诱导人肝癌 HepG2 细胞 48 h, 参照说明书的操作方法进行检测, 经荧光显微镜检测结果见图 2。

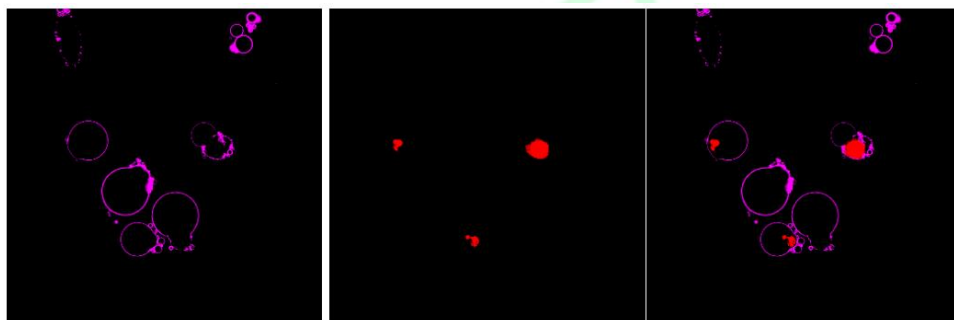


图 2. HepG2 细胞用本试剂盒染色后荧光显微镜检测细胞凋亡的效果图。HepG2 细胞经 DDP (10 μ M) 作用 48 h 后, 用本试剂盒染色, 然后用荧光显微镜检测; (左) 紫红色 APC 通道; (中) 红色 7-AAD 通道; (右) 合并视野。图中紫色荧光为 Annexin V APC 染色阳性细胞, 红色荧光为 7-AAD 染色阳性细胞。仅被紫色荧光染色的为早期凋亡细胞, 被紫色和红色荧光双染的是晚期凋亡细胞。