

## rh Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒 (100T)

目录号: ANT006

规格: 100 Tests

储存: 2-8°C

简介: 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与核酸结合, 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+)。

组份:

rh Annexin V-APC: 0.5ml

Binding Buffer (4X): 20ml

7AAD (20 µg/ml): 1ml

应用: Flow Cytometric Analysis

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:

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°C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°C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 $1-5 \times 10^6$ /ml；
  4. 取100 $\mu$ l的细胞悬液于5ml流式管中，加入5 $\mu$ l rh Annexin V APC，用移液器轻柔吹吸混匀，室温避光孵育5min；
  5. 加入10 $\mu$ l 7-AAD，并加400 $\mu$ l 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。

样本分析：

APC 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)，APC 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 APC 和 7-AAD双阴性群，早期凋亡细胞为 APC 阳性且 7-AAD 阴性群，晚期凋亡或坏死的细胞为 APC 和7-AAD 双阳性群。

相关产品：

- ANT001rh Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒（20T）
- ANT002rh Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒（50T）
- ANT003rh Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒（100T）
- ANT004rh Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒（20T）
- ANT005rh Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒（50T）
- ANT007rh Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒（20T）
- ANT008rh Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒（50T）