

# Annexin V-FITC/7-AAD Apoptosis detection Kit

## Annexin V-FITC/7-AAD细胞凋亡检测试剂盒

产品编号: MA0428 规格: 10T/ 50T/ 100T

### 产品内容

产品组成	MA0428-10T	MA0428-50T	MA0428-100T
Annexin V-FITC	50µl	250µl	500µl
7-AAD	100µl	500µl	1ml
Binding Buffer(10x)	5ml	25ml	50ml
说明书	1份	1份	1份

### 产品简介

本试剂盒用于检测细胞凋亡早期的发生, 其中 Annexin V 为胞内蛋白膜联蛋白家族成员, 以钙离子依赖的方式选择性与磷脂酰丝氨酸(PS)结合。

PS 正常分布在细胞膜内侧, 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 PS 外翻到细胞膜外侧。用带有 FITC 标记的 Annexin V, 即 Annexin V-FITC, 就可以通过流式细胞仪或荧光显微镜检测到 PS 外翻这一细胞凋亡的重要特征。

7-氨基放线菌素 D (7-AAD) 是一种非侵入性染料, 可以用来检测无活性的细胞。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。染料一旦进入细胞, 它将结合到细胞内 DNA 分子上, 在合适波长激发光的激发下发出明亮的红色荧光。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-FITC/PE 联合使用。

将 Annexin V-FITC 与 7-AAD 联合使用时, 7-AAD 被排除在活细胞 (Annexin V-/7-AAD-) 和早期凋亡细胞 (Annexin V+/7-AAD-) 外, 而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 FITC 和 7-AAD 结合染色呈现双阳性 (Annexin V+/7-AAD+)。

FITC 最大吸收波长为 490nm, 激发波长为 525nm。7-AAD 可被 488 nm 氩离子激光激发, 发射波长为 647nm。

### 保存条件

2-8℃避光保存, 一年有效。Annexin V-FITC不可冷冻。

## 操作步骤

### 1. 样品染色

- 1) 将 Binding Buffer (10x) 稀释成 1x Binding buffer 工作液备用 (1ml Binding Buffer (10x) 需加入 9ml 无菌去离子水)。
- 2) 对于悬浮细胞, 500-1000g 离心 5min 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, 500-1000g 离心 5min 收集细胞。
- 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, 共洗涤两次。
- 4) 在细胞沉淀中加入 1x Binding buffer 工作液, 重悬细胞, 使细胞浓度达到  $1 \times 10^6$  cell/ml。
- 5) 吸取 100 $\mu$ l 细胞悬液 (细胞总数为  $1 \times 10^5$  cell) 至一新管中, 加入 5 $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5-10  $\mu$ l 7-AAD, 轻轻混匀, 室温避光孵育 15min。

### 2. 样品检测

#### 1) 流式细胞仪检测:

染色孵育后, 每管加入 400 $\mu$ l 1x Binding Buffer 工作液, 混匀后使用流式细胞仪检测 (1 小时内检测)。

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。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。

#### 2) 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 7-AAD。被 Annexin V-FITC 结合的细胞显示浆膜上有绿色光环。丧失细胞膜完整性的细胞, 细胞核显示红色, 膜上有绿色光环。

## 注意事项

- 1、可立式离心管内试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。
- 2、Annexin V-FITC 和 7-AAD 是光敏物质，在保存与操作时请注意避光。
- 3、在细胞洗涤的最后一步，请尽量将上清弃净，以免 PBS 残留影响实验结果。
- 4、为获得准确试验结果，建议样品在染色后 1 小时内进行分析。
- 5、为了您的安全和健康，请穿戴实验防护服、手套、口罩等必要的防护装备。