

Annexin V-PE/7AAD 细胞凋亡检测试剂盒

编号: BA00207

产品介绍:

磷脂酰丝氨酸 (PS) 是一种带负电荷的磷脂, 正常细胞中, 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 PS 由脂膜内侧翻向细胞膜外侧, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。Annexin V 是一种分子量为 35~36kD 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 被公认为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。

将 Annexin V 标记荧光蛋白 PE, 以此作为探针, 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, 它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜, 但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞, 7-AAD 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此采用 Annexin V-PE 与 7-AAD 双染的方法, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

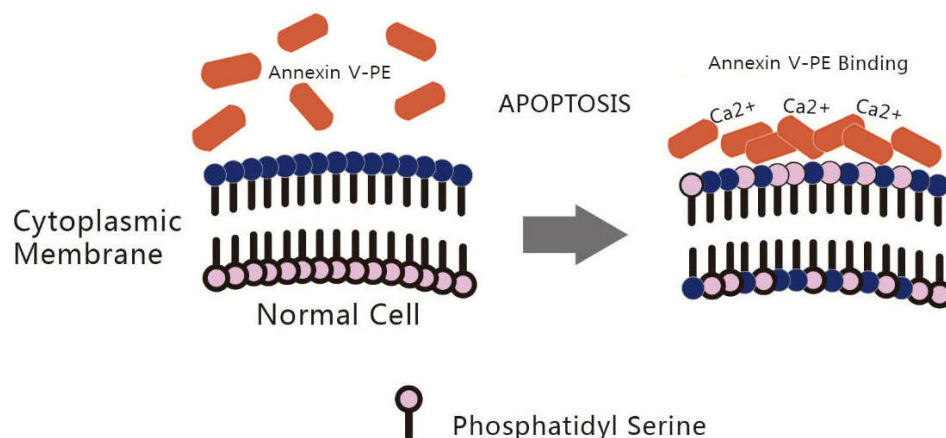


图 1. 细胞凋亡过程中磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻示意图

试剂盒组份:

组份	20T	50 T	100T	保存条件
Annexin V- PE	100 μl	250 μl	500 μl	4℃ 避光
7-amino-actinomycin D, 7AAD	200 μl	500 μl	1000 μl	4℃ 避光
Binding Buffer (4×)	4 ml	10 ml	20 ml	4℃

所需实验器材和试剂:

1. 微量移液器
2. PBS
3. 不含 EDTA 的胰酶消化液
4. 低速离心机
5. 流式细胞仪

注意事项:

1. 此试剂盒仅供研究使用。
2. 微量试剂需离心数秒将试剂收集至管底后再开盖取用。
3. 7-AAD(7-amino-actinomycin D)有毒,操作时要带手套,使用时避免与皮肤,眼睛和黏膜接触。
4. Annexin V-PE中含有毒性成分叠氮化钠(NaN_3),操作时要带手套,使用时避免与皮肤,眼睛和黏膜接触。
5. 本试剂盒用于检测活细胞,流式细胞仪检测时,细胞数量不应低于 1×10^6 。
6. 染色后宜尽快检测,时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
7. Annexin V检测凋亡细胞的方法适用于悬浮生长的细胞,如:淋巴细胞等细胞的检测。对于贴壁生长的细胞,由于在胰酶等消化处理过程中会造成细胞膜的损伤,会造成较高的假阳性,而用细胞刮子会造成细胞粘连成团,而影响检测,可将胰酶消化后的细胞保存在含2%BSA的PBS中,防止进一步的损伤。尽管目前,包括国外也有一些单位采用该方法检测贴壁生长的细胞。我们不推荐用该方法检测。因为其重复性较差,且需要操作时非常小心。
8. 消化贴壁细胞残留的胰酶会消化并降解Annexin V-PE,最终导致染色失败。
9. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭,请不要固定样品。

操作说明:

1. 细胞样品的准备:
 - a) 悬浮细胞:
 - i. 收集细胞至离心管中 1000-2000rpm 离心 5min,小心去除上清。
 - ii. 用 1ml 4°C预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数,1000-2000rpm 离心 5min,小心吸除上清。
 - iii. 再加入 1ml 4°C预冷的 PBS 重悬细胞,1000-2000rpm 离心 5min,小心吸除上清。
 - b) 贴壁细胞:
 - i. 吸出细胞培养液至离心管中, PBS 洗涤贴壁细胞一次,加入适量不含 EDTA 的胰酶细胞消化液消化细胞。
 - ii. 室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时,吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化。
 - iii. 加入步骤 i 中收集的细胞培养液,稍混匀,转移到离心管内,1000-2000rpm 离心 5min,小心吸除上清。

注:加入步骤 i 中的细胞培养液一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞,另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶;残留的胰酶会消化并降解后续加入的 Annexin V- PE 导致染色失败。
 - iv. 用 1ml 4°C预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数,1000-2000rpm 离心 5min,小心吸除上清。
 - v. 再加入 1ml 4°C预冷的 PBS 重悬细胞,1000-2000rpm 离心 5min,小心吸除上清。
2. 用去离子水按 1: 4 稀释 Binding Buffer (4ml Binding Buffer (4×)+12ml 去离子水);
3. 用 250μl 结合缓冲液重新悬浮细胞,调节其浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$;
4. 取 100μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5μl Annexin V- PE,轻轻混匀;
5. 室温(20-25°C)避光孵育 5min;
6. 上机前 5 min 加入 10μl 7-AAD 溶液,轻轻混匀;
7. 上机前在反应管中补加 400μl PBS 重悬细胞,避光保存,随即进行流式细胞仪(FC)检测。

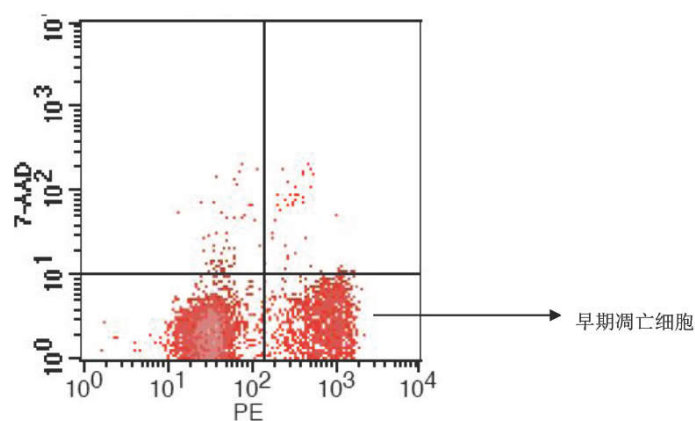


图 2. Jurkat 细胞用紫外诱导凋亡后用 Annexin V-PE/7AAD 双染流式分析图谱

参考文献:

1. Wu XX, Sun Y, Zhou XB, Zhang J, Yu BY, Xu Q. Effect of Bufotalin on the Apoptosis of BGC-823 Cells. *Chinese medicine and clinical pharmacology of new drugs*. 2007 March, Vol. 18 No. 2.
2. Yang L, Zhou X, Yang J, Yin X, Han L, Zhao D. Aspirin inhibits cytotoxicity of prion peptide PrP106-126 to neuronal cells associated with microglia activation in vitro. *J Neuroimmunol*. 2008 Aug 13;199(1-2):10-7.
3. Gao C, Jiang Y, Tan C, Zu X, Liu H, Cao D. Synthesis and potent antileukemic activities of 10-benzyl-9(10H)-acridinones. *Bioorg Med Chem*. 2008 Sep 15;16(18):8670-5. Epub 2008 Aug 5.
4. Wang LM, Li QY, Zu YG, Fu YJ, Chen LY, Lv HY, Yao LP, Jiang SG. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of CPT13, a novel camptothecin analog, on human colon cancer HCT8 cell line. *Chem Biol Interact*. 2008 Nov 25;176(2-3):165-72. Epub 2008 Jul 30.
5. Wang L, Li Z, Wang C, Yang Y, Sun L, Yao W, Cai X, Wu G, Zhou F, Zha X. E-cadherin decreased human breast cancer cells sensitivity to staurosporine by up-regulating Bcl-2 expression. *Arch Biochem Biophys*. 2009 Jan 1;481(1):116-22. Epub 2008 Nov 1.
6. Yan HL, Xue G, Mei Q, Wang YZ, Ding FX, Liu MF, Lu MH, Tang Y, Yu HY, Sun SH. Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *EMBO J*. 2009 Sep 16;28(18):2719-32. Epub 2009 Aug 20.
7. Ji YB, Qu ZY, Zou X. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. *Exp Toxicol Pathol*. 2009 Oct 6.

相关细胞凋亡检测产品:

产品编号	产品名称	应用
BA00101	Annexin V -FITC/PI Apoptosis assay Kit	FC
BA00102	AnnexinV Alexa Fluor488/PI Apoptosis assay Kit	FC
BA00103	AnnexinV Alexa Fluor647/PI Apoptosis assay Kit	FC
BA00204	Cell Cycle Analysis Kit	FC
BA00205	Cell Cycle Analysis Kit (with RNase)	FC
BA00206	Annexin V-eGFP Apoptosis assay Kit	FC
BA00207	Annexin V PE/7-AAD Apoptosis assay Kit	FC