

Annexin V-PE/ 7AAD Kit 凋亡检测试剂盒

货号: AC10861

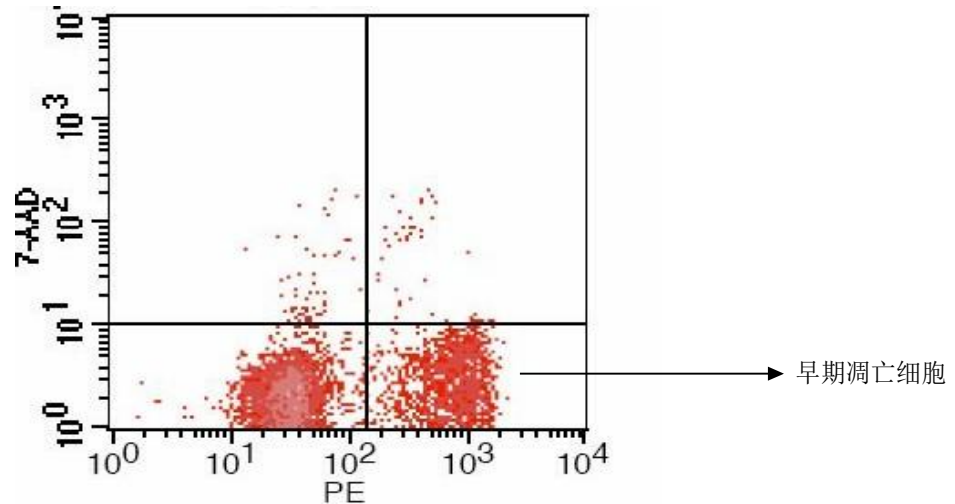
规格: 20T/50T/100T

保存: 2-8°C 避光保存, 勿冰冻。

产品内容:	AC10861-20	AC10861-50	AC10861-100
4x (Binding Buffer 4x)	4ml	10ml	20ml
7-AAD Viability Staining Solution	0.2ml	0.5ml	1.0ml
rh Annexin V/PE	0.1ml	0.25ml	0.5ml

产品简介:

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破坏了。因此, 可以采用 AnnexinV 与7-AAD 双染的方法, 通过流式检测细胞早期凋亡。



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

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。用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 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。1000rpm 左右离心 5min, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞无法完全离心至离心管底, 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 μ l 左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约 1ml 4°C 预冷的 PBS, 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清;
- b) 对于悬浮细胞: 1000rpm 左右离心 5min, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞无法完全离心至离心

管底，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 μ l 左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1ml 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清；

- 2、用去离子水按 1:3 稀释结合缓冲液(4ml 4x 结合缓冲液+12ml 去离子水)；
- 3、用 1x 结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为 $1-5 \times 10^6$ /ml；
- 4、取 100 μ l 的细胞悬液于 5ml 流式管中，加入 5 μ l Annexin V/PE 混匀后于室温避光孵育 5 分钟；
- 5、加入 10 μ l 20ug/ml 的 7AAD，并加 400 μ l PBS，立刻进行流式检测。

实验设计：

1) 未转染细胞

空白管：阴性对照组细胞，不加 Annexin V/PE，7AAD，用于调节电压。

单染管：阳性对照组细胞，只加 Annexin V/PE 或只加 7AAD，用于调节补偿。

检测管：处理的细胞，加 Annexin V/PE，7AAD。用空白管和单染管调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

2) 转染 GFP

未转染空白管：未转染细胞，不加 Annexin V/PE，7AAD，用于调节电压。

未转染单染管：未转染且有明显凋亡的细胞，只加 Annexin V/PE 或只加 7AAD，用于调节补偿。

转染 GFP 空白管：转染 GFP 对照组细胞，不加 Annexin V/PE，7AAD，用于调节补偿。

检测管：处理的细胞，加 Annexin V/PE，7AAD。调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

注意事项：

- 1、Annexin V 是与磷脂酰丝氨酸(PS)亲和，而 PS 在不同种属间没差异。在正常细胞中，PS 只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，PS 由脂膜内侧翻向外侧。
- 2、低浓度胰酶消化，轻柔吹打贴壁细胞 2~3 次，离心机 4 $^{\circ}$ C 1000rpm 5min 离心，处理得当的话，胰酶造成损伤可以控制在 5%以内，有对照组的情况下对实验结果不会造成明显影响。
- 3、先加 PI 不仅染色是否每组都均匀充分很难判断，而且 PI 本身对细胞也是有毒性的，对实验结果影响会比胰酶大，不建议这样做。
- 4、Annexin V 是 Ca 依赖的蛋白，所以不能加入 EDTA，防止 EDTA 螯合了 Ca 离子从而影响 Annexin V，进而影响结果。
- 5、用流式检测凋亡时，7AAD 受时间的影响很大，因标记了 7AAD 后会加大细胞毒性，随着时间延长会导致 7AAD 的染色增加，特别是检测早期凋亡时，如果时间延长除了会导致在流式细胞仪上的细胞分群差距加大外，误差会明显加大。一般 7AAD 加上后立刻上机，然后在一个小时內检测完成。两种方法都可以，但是按照我们操作步骤造成的误差会更小。

相关文献：

- [1] Ruifeng Zhao, Jing Jin, Xinyu Sun, et al. The establishment of clonally derived chicken embryonic fibroblast cell line (CSC) with high transfection efficiency and ability as a feeder cell. *Journal of cellular Biochemistry*. August 2018. (IF 2.959)