Annexin V-Alexa Fluor 647/7-AAD Kit　凋亡检测试剂盒

Catalog No.	Size
FXP147-100	100 Tests
FXP147-050	50 Tests
FXP147-020	20 Tests

相关介绍：

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 Annexin V 与 7-AAD 双染的方法，通过流式检测细胞早期凋亡。

储存条件：

2-8℃避光保存，勿冰冻。

注意事项：

本试剂盒需使用流式细胞仪进行检测。
此产品仅供研究，不用于临床诊断。

试剂盒组份：

1. 结合缓冲液 4x (Binding Buffer 4x)

体积：20 Tests: 4ml（4倍浓缩液）
50 Tests: 10ml（4倍浓缩液）
100 Tests: 20ml（4倍浓缩液）

稀释后溶液中各组分浓度：10mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM $CaCl_2$

2. 7-AAD Viability Staining Solution

体积： 20 Tests: 0.2ml
50 Tests: 0.5ml
100 Tests: 1.0ml
浓度： 20ug/ml

3. 重组人Annexin V/Alexa Fluor 647, (rh Annexin V/Alexa Fluor 647)

来　　源：大肠杆菌（E.coli）
分 子 量：35.8 KDa
样 品 量：20 Tests: 0.1ml，可用于20次实验
50 Tests: 0.25ml，可用于50次实验

100 Tests: 0.5ml，可用于100次实验

保存方法：于50mM Tris, 100mM NaCl, 1%BSA, 0.02%NaN_3,pH7.4 溶液中保存

纯　　度：SDS-PAGE及反相HPLC表明纯度大于98%

生物活性：Annexin V可结合于磷酯酰丝氨酸并表现出抗磷酯酶活性

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50μl左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约1ml 4℃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50μl左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约1ml 4℃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1-5×10^6/ml；

4. 取100μl的细胞悬液于5ml流式管中，加入5μl Annexin V/Alexa Fluor 647混匀后于室温避光孵育5分钟；

5. 加入10μl 20ug/ml的7-AAD，并加400μl 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/Alexa Fluor 647，7-AAD。用于调节电压

检测管：处理的细胞，加 Annexin V/Alexa Fluor 647，7-AAD。用空白管和单阳管调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

注：无需用单染管Annexin V/Alexa Fluor 647调补偿。

2)转染GFP细胞

未转染空白管：未转染细胞，不加Annexin V/Alexa Fluor 647，7-AAD。用于调电压

转染GFP空白管：转染GFP对照组细胞，不加Annexin V/Alexa Fluor 647，7-AAD。用于调补偿

检测管：处理的细胞，加 Annexin V/Alexa Fluor 647，7-AAD。调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

常见问题：

1、Annexin V/ 7-AAD 凋亡检测的试剂盒能否检测人以外其他动物的细胞凋亡情况？

可以。因为 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、贴壁细胞做凋亡用胰酶消化下来对细胞膜损伤？

低浓度胰酶消化，轻柔吹打贴壁细胞 2～3 次，离心机 4℃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、贴壁细胞可以先染 7-AAD 然后再消化下来吗？这样是否可以减小由于消化液造成的细胞膜破损而染上的 7-AAD 的误差？

先加 7-AAD 不仅染色是否每组都均匀充分很难判断，而且 7-AAD 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、为什么只能用不含 EDTA 的胰酶消化贴壁细胞，用含 EDTA 的胰酶消化细胞对结果有什么影响？

因为 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、有些厂家说明书 Annexin V 和 7-AAD 一起加？为什么你们先加 Annexin V 后加 7-AAD？

用流式检测凋亡时，7-AAD 受时间的影响很大，因标记了 7-AAD 后会加大细胞毒性，随着时间延长会导致 7-AAD 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 7-AAD 加上后立刻上机，然后在一个小时内检测完成。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。

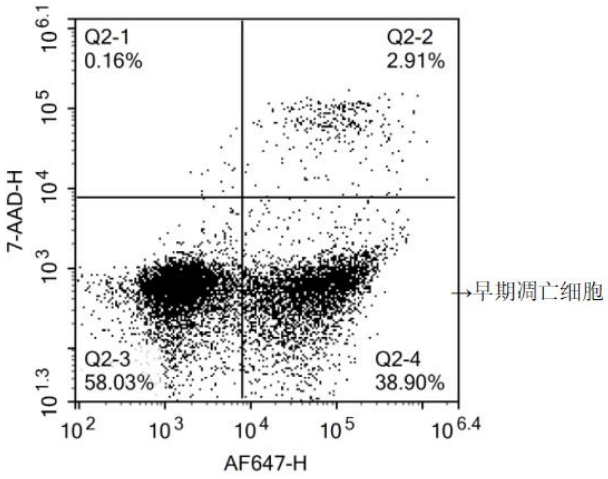
6、你们哪种凋亡检测试剂盒能用于转染 GFP 细胞的凋亡检测？

FXP022 Annexin V- PE/7AAD　凋亡检测试剂盒

FXP023 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI Kit　凋亡检测试剂盒

FXP147 Annexin V-Alexa Fluor 647/7-AAD Kit　凋亡检测试剂盒

实验参考图



Jurkat 细胞用紫外诱导凋亡后用 Annexin V-Alexa Fluor 647/7-AAD 双染流式分析图谱

相关产品

Catalog No.	Product Name	Applications
FXP018	AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒	FC
FXP022	AnnexinV-Alexa Fluor 488/PI　凋亡检测试剂盒	FC
FXP023	AnnexinV-Alexa Fluor 647/PI 凋亡检测试剂盒	FC
FXP025	AnnexinV-eGFP/PI　凋亡检测试剂盒	FC
FXP027	Annexin V- PE/7-AAD　凋亡检测试剂盒	FC
FXP145	AnnexinV-FITC/7-AAD 凋亡检测试剂盒	FC
FXP146	AnnexinV-Alexa Fluor 488/7-AAD 凋亡检测试剂盒	FC