



多沃生物

Dowobio Biotechnology Co., Ltd



AnnexinV Alexa Fluor647/PI/凋亡检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
DW0073	AnnexinV Alexa Fluor647/PI/凋亡检测试剂盒	50T

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內面, 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。

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 $^{\circ}$ 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/Alexa Fluor 488 混匀后于室温避光孵育 5 分钟;

5. 加入 10 μ l 20ug/ml 的 7-AAD, 并加 400 μ l PBS, 立刻进行流式检测。

实验设计:

空白管: 阴性对照组细胞, 不加 Annexin V/Alexa Fluor 488 和 7-AAD, 用于调节电压。

单染管 1: 阳性对照组细胞, 只加 Annexin V/Alexa Fluor 488, 用于调节补偿。

单染管 2: 阳性对照组细胞, 只加 7-AAD, 用于调节补偿。

检测管: 处理的细胞, 加 Annexin V/Alexa Fluor 488, 7-AAD。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。

样本分析:

1 流式细胞仪分析: Alexa Fluor488 的最大激发波长是 495nm, 最大发射波长是 519nm, 建议选择 FL1 通道检测; 7-AAD-DNA 复合物的最大激发波长是 546nm, 最大发射波长为 647nm, 7-AAD 的红色荧光在 FL3 通道检测。用 FlowJo 等软件进行分析, 绘制双色散点图 (two-color dot plot), Alexa Fluor488 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 亡或坏死的细胞有绿色和红色荧光双重染色。



多沃生物

Dowobio Biotechnology Co., Ltd



2 荧光显微镜观察： a)滴一滴用 Annexin V-Alexa Fluor 488/7-AAD 双染的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。 b)在荧光显微镜下用双色滤光片观察。Annexin V-Alexa Fluor 488 荧光信号呈绿色，7-AAD 荧光信号呈红色。

【注】：对于贴壁细胞，可直接用盖玻片培养细胞并诱导细胞凋亡。

注意事项：

1. 不能用含有 EDTA 的胰酶消化
2. 本试剂盒需使用流式细胞仪进行检测。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品文章中的写法：

英文：Dowobio (Shanghai, China)

中文：上海多沃生物科技有限公司 Dowobio, 上海