Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒

货号: KTA0007　　规格：20 T/50 T/100 T　　批号：见产品标签

	应用实验：流式细胞术
	荧光激发/发射波长：Annexin V- APC: Ex/Em=650 nm/660 nm, 7-AAD: Ex/Em=546 nm/647 nm
	保质期：4℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

细胞凋亡，或称程序性细胞死亡，是一种用于清除不需要的细胞的正常生理过程。凋亡早期事件之一是膜磷脂酰丝氨酸（PS）从质膜内侧转移到细胞表面。

Annexin V 是一种 35-36 kDa Ca^{2+}依赖性磷脂结合蛋白，对 PS 具有高度亲和力。用荧光染料标记的 Annexin V 可通过与暴露的 PS 结合来识别凋亡细胞。7-AAD 是一种膜不透性核酸染料，不能进入正常细胞和早期凋亡细胞（仍具有膜完整性结构），但能进入细胞膜受损的晚期凋亡和坏死细胞内与核酸结合，形成近红色荧光。Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒为细胞凋亡提供了一种快速简便的检测方法，细胞在含 Ca^{2+}的结合缓冲液中用 Annexin V-APC 和 7-AAD 染色后，早期凋亡细胞显示仅 Annexin V 阳性，死细胞显示 Annexin V 和 7-AAD 阳性，活细胞显示 Annexin V 和 7-AAD 阴性。此外，针对凋亡检测补偿调节，本试剂盒还特别提供细胞阳性对照试剂。检测可通过流式细胞仪或荧光显微镜进行分析。

02 包装清单

试剂盒组分	规格			储存条件
	20 T	50 T	100 T	
Annexin V Binding Buffer (5×)	3 mL	7.5 mL	15 mL	4℃
Annexin V-APC	100 μL	250 μL	500 μL	4℃，避光保存
7-AAD	100 μL	250 μL	500 μL	4℃，避光保存
Apoptosis Positive Control Solution	5 mL	5 mL	5 mL	4℃

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	流式细胞仪	流式推荐 APC 和 PerCP 通道
耗材	吸头	/
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4），去离子水	清洗
其他	离心机、移液枪	/

04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
1×Annexin V Binding Buffer	即用型；用去离子水把 Annexin V Binding Buffer (5×)稀释成 1×Annexin V Binding Buffer	未用完的试剂 4℃可保存 6 个月
Annexin V-APC	即用型；使用前，平衡到室温	4℃避光保存。
7-AAD	即用型；使用前，平衡到室温	4℃避光保存，7-AAD 在 4℃、冰浴等较低温度情况下会凝固，可以 20-25℃水浴温育至全部融解。
Apoptosis Positive Control Solution	即用型；使用前，平衡到室温	4℃保存

05-2 实验步骤

05-2-1 仪器参数调节

(1) 收集 1- 3×10^6 个细胞，用预冷的 PBS 离心洗涤 2 次，弃上清。

(2) 加入 500 μL Apoptosis Positive Control Solution 重悬，置冰上孵育 30 min。

(3) 用预冷 PBS 离心洗涤，弃上清。

(4) 加入适量预冷 1 ×Annexin V Binding Buffer 重悬，并加入数量相同且未经处理的活细胞与之混合。加入预冷 1×Annexin V Binding Buffer 补充至 1.5 mL，等分成三管，其中一管为空白对照管、两管为单染管。

(5) 单染管分别加入 5 μL Annexin V-APC 或 5 μL 7-AAD，室温避光孵育 15 min。

(6) 在流式细胞仪上，用空白管调节 FSC、SSC 和荧光通道的电压，并在此电压条件下，用单染管调节荧光通道的补偿。

05-2-2 流式细胞仪分析

(1) 通过所需方法诱导细胞凋亡，同时培养无诱导的对照培养物。

(2) 4℃，300 g 离心 5 min 收集 0.1-1×10^6 细胞，用冰预冷的 PBS 洗涤 2 次。

注意：贴壁细胞使用胰酶（不含 EDTA）消化后离心收集细胞，如果消化时间过长，易造成细胞膜结构损伤而出现细胞坏死的假阳

性，所以需控制胰酶消化时间（推荐使用温和消化液）。

(3) 用 500 μL 1×Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。

(4) 每 500 μL 细胞悬液中加入 5 μL Annexin V-APC 和 5 μL 7-AAD，轻柔混匀。

(5) 室温避光孵育 15 min。

(6) 孵育结束后置于冰上。染色后 30 min 内通过流式细胞仪分析细胞。分别使用 APC 通道和 PerCP/Cy5.5 检测。

注意：在 05-2-1-2 步骤 Apoptosis Positive Control Solution 处理细胞后，用于仪器参数调节的空白管对照管、APC 单染管及 7-AAD 单染管，可以和样本管同时染色。

06 结果示例

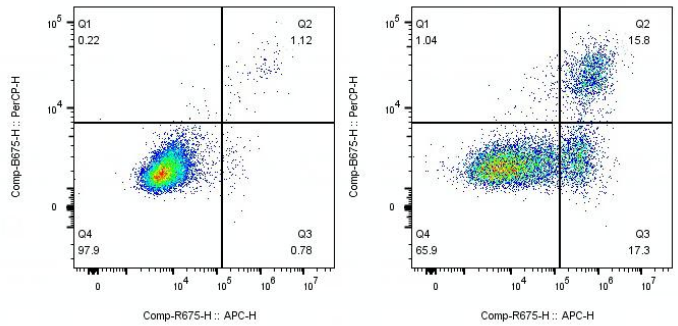


Figure 1. Jurkat 细胞用 DMSO（左）或 A+B (1:4000)（右）处理 16 h 后用 Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒染色。染色样本用流式细胞仪进行检测，Annexin V-APC 用 APC 通道检测; 7-AAD 用 PerCP 通道检测。细胞分群主要分为活细胞（Q4），早期凋亡（Q3）和晚期凋亡（Q2），诱导后，凋亡细胞比例明显增加。

07 FAQ

1．实验结果如何判断?

活细胞—没有荧光（Q4, Annexin V-/7-AAD-）、早期凋亡细胞—细胞膜近红外荧光（Q3, Annexin V+/7-AAD-）、晚期凋亡细胞和坏死细胞呈现双阳性—细胞膜近红外荧光，细胞核红色荧光（Q2, Annexin V+/7-AAD+）、机械损伤或裸核—细胞核红色荧光（Q1, Annexin V-/7-AAD+）。

2．有其它方法做阳性对照吗?

将细胞 55℃水浴/金属浴孵育 30min，与正常细胞 1:1 混合可作为单阳管及阳性对照管。但如果要跟实验组对比和调补尝建议采用相同方式诱导。

3．可以用 PBS 代替 1×Annexin V Binding Buffer 吗?

不可以，因为 Annexin V 与磷脂酰丝氨酸（PS）的结合依赖 Ca^{2+}，而常见的 PBS 溶液中不含 Ca^{2+}，不加 Binding Buffer，会导致 Annexin V 的结合能力降低，造成阳性信号大幅下降甚至无阳性信号。

4．用含 EDTA 的胰酶处理细胞，会不会受影响?

细胞消化时尽量避免使用 EDTA，若使用含 EDTA 的胰酶处理可使用 PBS 增加洗涤次数。

5．可以使用荧光显微镜检测吗?

Annexin V-APC 为近红外荧光，需要有相应的滤光片才能检测，如果用于荧光显微镜下检测，推荐 100μL1×AnnexinV Binding Buffer 添加 5 μL AnnexinV-APC 和 5 μL 7-AAD 配制染色工作液，室温避光染色 15 min，染色后用 1×Annexin V Binding Buffer 洗涤细胞

2 次（可选）。AnnexinV-APC 可以使用 Cy®5 设置拍照，7-AAD 可以使用 Cy®3 或 TexasRed®设置拍照。传统汞灯热光源用于 Cy®5 成像效果差，推荐使用采用激光激发的共聚焦显微镜及 LED 荧光光源的荧光显微镜检测。

08 相关产品

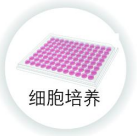
货号	试剂盒名称
KTA2010	**一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）**
KTA2011	**一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）**
KTA2020	**细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）**
KTA2021	**细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）**
KTA2031	**EdU 法细胞增殖成像分析试剂盒（橙色荧光）**
KTA3022	**Caspase-3 活性分析试剂盒（比色法）**
KTA4001	**线粒体膜电位分析试剂盒（JC-1）**
BMU106	**SuperKine™ 超敏型细胞增殖检测试剂（CCK-8）**

Annexin V-APC/7-AAD细胞凋亡检测试剂盒

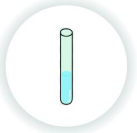
（Abbkine 货号 ： KTA0007）

预处理成单细胞悬液

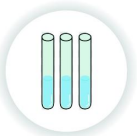
①



收集细胞，PBS洗涤2次，弃上清
加入500 μL Apoptosis Positive Control Solution,冰上孵育30 min



PBS洗涤，适量预冷1 ×Annexin V Binding Buffer重悬



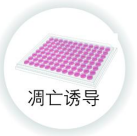
加入相同数量未处理活细胞混合
加入预冷1×Annexin V Binding Buffer补充至1.5 mL
等分成3管，空白管和两管单染管
单染管分别加入5 μL Annexin V-APC或5 μL 7-AAD
避光孵育15 min



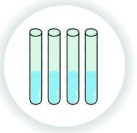
仪器参数调节

试剂名称	试剂准备
1 ×Annexin V Binding Buffer	用去离子水稀释至1×。

②



弃上清，PBS洗涤2次
加入500 μL 工作液



避光孵育15 min



流式细胞仪分析
（APC和PerCP）

预处理成单细胞悬液

工作液配置（500 μL）：

1×Annexin V Binding Buffer	500 μL
Annexin V-APC	5 μL
7-AAD	5 μL