

产品说明书

产品名称: Annexin V-APC

产品货号: BN16080

产品规格: 1 mL (200T)

储存条件

4℃避光冷藏, 请勿冻存。本产品推荐条件下可以储存 6 个月。

光谱特性

Annexin V-APC: Ex/Em = 650/660 nm

产品介绍

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。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, 该蛋白可作为敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的PS。

Annexin V-APC 可以与7-AAD/PI 等联合使用, 来检测细胞凋亡情况。7-AAD/PI 可被排除在活细胞和早期凋亡细胞之外, 而晚期凋亡细胞和坏死细胞可以同时被Annexin V-APC 和7-AAD 结合染色呈现双阳性, 从而来区分活细胞、早调细胞与晚调细胞。

使用方法

1. 根据实验要求诱导细胞凋亡。检测样品中应包含未经处理的细胞样品, 作为阴性对照。此外, 设定一组样品做单染, 用于调节补偿。

2. 沉淀细胞。

悬浮细胞: 1000 rpm, 离心 5 min 沉淀细胞;

贴壁细胞: 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 1000 rpm, 离心 5 min 沉淀细胞, 胰酶消化时间不宜过长, 以防引起假阳性。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微增大转速。小心吸除上清, 可以残留约50 μL 左右的培养液, 以避免吸走细胞。

注: 细胞用胰蛋白酶消化后, 使细胞在最佳培养条件和最适培养基中恢复约30分钟, 然后再染色。因为胰蛋白酶消化会暂时破坏质膜, 允许Annexin V结合磷脂酰丝氨酸在细胞膜的细胞质表面上, 从而导致假阳性染色。

3. 加入约1 mL 4℃预冷的PBS, 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清。

4. 用适当的缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度 $1-5 \times 10^6$ /mL (缓冲液可选择终浓度为 2 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 28 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂溶液)。

5. 取100 μL的细胞悬液于5 mL流式管中, 加入5 μL Annexin V-APC 混匀后于室温避光孵育5分钟。

6. 加入10 μL 20 μg/mL的7-AAD或PI, 并加400 μL PBS, 立刻进行流式检测。流式细胞仪检测时, Annexin V-APC用633nm激发器激发, 最大发射波长660 nm, 建议使用FL4或RL1通道检测。

注意事项:

1. 荧光染料均存在淬灭问题, 保存和使用过程中请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。