

**Annexin V-PE/7-AAD
Apoptosis Detection Kit**

A213



使用说明书

Version 21.2

目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	02
05/参考实例：流式细胞仪检测喜树碱诱导的Jurkat细胞凋亡	03
06/注意事项	04
07/实验流程	05
08/常见问题与解决方案	06

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

01/产品概述

细胞凋亡是胚胎发育和维持机体内稳态的一种正常生理过程。凋亡具有明显的形态学特征，包括细胞膜不对称性和附着性丧失、细胞质和核质浓缩、核小体间DNA断裂。细胞膜的破坏属于细胞凋亡的早期特征。在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸(PS)只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，细胞膜中的PS由内侧外翻至外侧，从而将PS暴露于细胞外部环境。Annexin V是一种35 - 36 kDa的Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白，与PS具有高度亲和力，故可通过细胞外侧暴露的PS与凋亡早期细胞的细胞膜结合。因此Annexin V被公认为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。

将Annexin V以藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)进行标记，标记后的Annexin V保留了与PS的高亲和力，可作为探针，利用流式细胞仪进行细胞凋亡的检测。由于在凋亡早期即发生PS外翻，故Annexin V-PE染色在凋亡早期就能识别出凋亡的发生。7-氨基放线菌素D(7-AAD)是一种核酸染料，7-AAD不能透过正常细胞或早期凋亡细胞完整的细胞膜，但可穿透膜损伤细胞如晚期凋亡细胞或者坏死细胞的细胞膜并与其内的DNA结合，可用来区分早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞或坏死细胞。因此将Annexin V-PE与7-AAD进行共染，就可以区分不同凋亡时期的细胞。在双色流式细胞仪散点图上，Annexin V-PE与7-AAD双阴性为正常细胞，Annexin V-PE阳性、7-AAD阴性为早期凋亡细胞，Annexin V-PE与7-AAD双阳性为晚期凋亡细胞或坏死细胞。

02/产品组分

组分	A213-01 (50 rxns)	A213-02 (100 rxns)
Annexin V-PE	250 µl	500 µl
7-AAD Staining Solution	250 µl	500 µl
1 × Binding Buffer	25 ml	2 × 25 ml

03/保存条件

本试剂盒所有组分均在2 ~ 8°C避光保存，Annexin V-PE和7-AAD Staining Solution需避光保存，勿冷冻。根据不同目的地调整运输方式。

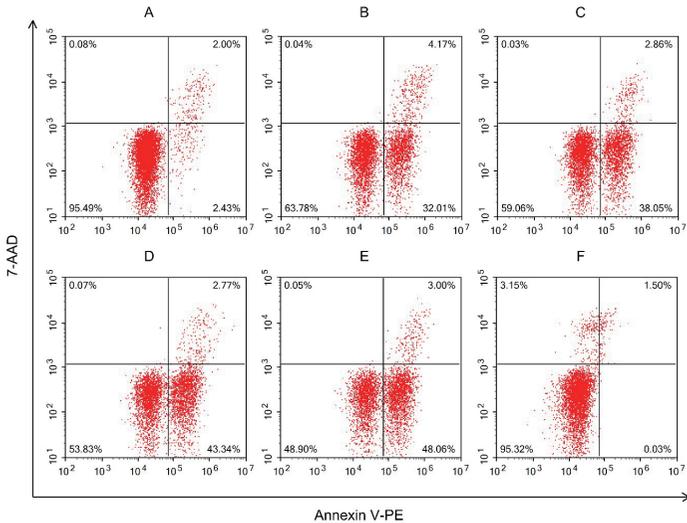
04/适用范围

本产品适用于贴壁及悬浮培养细胞的凋亡检测。

05/参考实例:流式细胞仪检测喜树碱诱导的Jurkat细胞凋亡

用喜树碱 (Camptothecin, CPT) 诱导 Jurkat 细胞 (人 T 淋巴瘤细胞) 凋亡, 诱导浓度分别为 0、4、8、12、16 μM , 分别诱导 4 h 后, 参照产品说明书实验方案进行染色, 用流式细胞仪检测结果如下图。

(A) 0 μM . (B) 4 μM . (C) 8 μM . (D) 12 μM . (E) 16 μM . (F) 竞争封闭实验, 采用 16 μM CPT 诱导 Jurkat 细胞 4 h 后, 参照说明书收集并洗涤细胞, 于染色前加入无染料标记的 Annexin V 蛋白孵育 10 min, 再进行 Annexin V-PE/7-AAD 染色。无染料标记的 Annexin V 结合了细胞上的 PS, 再进行染色时, Annexin V-PE 无法结合 PS, 这说明了染色的特异性。



06/注意事项

1. 由于细胞凋亡是一个快速的过程，建议样品在染色后1 h内进行上机分析。
2. 由于是通过检测细胞膜的变化来确定凋亡的发生及其所处阶段，所以Annexin V-PE和7-AAD染色前，不能用破坏细胞膜完整性的固定剂和穿透剂固定或穿膜。
3. 整个操作过程动作要尽量轻柔，勿用力吹打细胞，避免对细胞造成机械性损伤。
4. 对于贴壁细胞，消化是一个关键步骤。贴壁细胞诱导细胞凋亡时如有漂浮细胞，需收集漂浮细胞和贴壁细胞后合并染色。处理贴壁细胞时要小心操作，尽量避免人为的损伤。胰酶消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，导致7-AAD摄入过多；消化时间过长，细胞膜同样易造成损伤，甚至会影响细胞膜上PS与Annexin V-PE的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后，轻摇使胰酶与细胞充分接触，然后倒掉大部分胰酶，利用剩余少量胰酶再消化一段时间，待细胞间空隙增大，板底呈花斑状即可终止。尽量使用不含EDTA的胰酶，EDTA会影响Annexin V与PS的结合。
5. 如果样品来源于血液，请务必除去血液中的血小板。因为血小板含有PS，能与Annexin V结合，从而干扰实验结果。可以使用含有EDTA的缓冲剂并在1,400 rpm (200 × g) 离心洗去血小板。
6. 试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。
7. Annexin V-PE和7-AAD是光敏物质，在操作时请注意避光。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

07/实验流程

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，取实验组分别进行Annexin V-PE和7-AAD单染，用于调节补偿。
2. 收集细胞：收集 $1 - 5 \times 10^5$ 个细胞
 - 悬浮细胞：1,800 rpm (300 × g)、4°C离心5 min，弃培养基上清；
 - 贴壁细胞：用不含EDTA的胰酶消化细胞，终止消化后收集细胞，1,800 rpm (300 × g)、4°C离心5 min，弃上清。
3. 洗涤细胞：用预冷的PBS洗涤细胞两次，每次均在1,800 rpm (300 × g)、4°C离心5 min，弃上清。
4. 细胞重悬：加入100 μl $1 \times$ Binding Buffer，轻轻吹匀至单细胞悬液。
5. 细胞染色：加入5 μl Annexin V-PE和5 μl 7-AAD Staining Solution，轻轻吹匀；避光、室温(20 ~ 25°C)孵育10 min；加入400 μl $1 \times$ Binding Buffer，轻轻混匀。染色后样品在1 h内用流式细胞仪检测。
 - ▲ 为了避免洗涤细胞时损失细胞，在吸液时可以用大枪头套上小枪头吸液。
6. 样品分析

流式细胞仪激发波长为488 nm；PE的荧光在FL2通道检测；7-AAD的荧光在FL3通道检测，每个样本采集10,000 events。用FlowJo等软件进行数据分析，FL2为横坐标，FL3为纵坐标，根据PE和7-AAD荧光值确定两荧光参数阴阳界限，划定十字门。典型的实验中细胞可分为三个亚群：正常细胞为双阴性(Annexin V-PE⁻/7-AAD⁻)；早期凋亡细胞为Annexin V-PE单阳性(Annexin V-PE⁺/7-AAD⁻)；晚期凋亡细胞为Annexin V-PE和7-AAD双阳性(Annexin V-PE⁺/7-AAD⁺)。

08/常见问题与解决方案

◇ Annexin V-PE染色失败或者阳性率偏低。

首先要确定实验中使用的诱导剂是否能产生凋亡。可通过设定确切凋亡诱导效果的阳性药物对照来排除这一情况。

Annexin V-PE染色失败，最常见的实验操作原因是贴壁细胞消化不当。Annexin V跟PS的结合需要 Ca^{2+} ，Binding Buffer中含有2.5 mM的 Ca^{2+} ，含EDTA的胰酶消化会影响染色，建议使用无EDTA的胰酶。若使用含EDTA的胰酶，必须通过洗涤步骤彻底去除EDTA。

用PBS洗涤细胞沉淀后，应尽量去除残余液体。残留PBS中的磷酸根，会形成磷酸钙沉淀。

Binding Buffer的瓶盖要紧闭，防止空气中的 CO_2 进入后形成碳酸钙沉淀，减少游离 Ca^{2+} ，导致实验失败。

接触其他缓冲液如吸取PBS后不更换枪头也会导致游离的 Ca^{2+} 减少。

一些细胞其细胞膜上PS的密度较低，染色效果很差，此时建议更换细胞株或者采用TUNEL试剂盒(Vazyme #A111/A112/A113)检测凋亡。

如果是贴壁细胞，药物诱导后漂浮的细胞也要收集，这部分细胞往往是凋亡阳性的细胞，丢弃会造成阳性结果偏低。

◇ 假阳性

实验中发现未经诱导凋亡的对照细胞经染色后Annexin V-PE/7-AAD双阳性比例过高，造成这种结果的原因可能是细胞本身活力低。建议用台盼蓝染色计算细胞活力，未经药物处理的阴性对照台盼蓝拒染的细胞应大于95%。若细胞活力低，建议重新复苏细胞，通常刚复苏的细胞至少应传代2 - 3次以后才能进行实验。

另一可能是细胞操作不当引起，操作过程中吹打细胞过于剧烈，贴壁细胞消化过程中消化时间过长，均可能导致细胞膜破坏，出现假阳性。

此外，一般情况下诱导几个小时就可以出现早期凋亡，因此通常不需要处理大于48 h以上；诱导时间过长会使营养物质耗尽，导致细胞状态差，假阳性结果偏高。



Vazyme Biotech Co., Ltd.

Web: www.vazyme.com

Tel: 400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

Service: service@vazyme.com

