

Annexin V-Biotin conjugate

15 min 速染，信号放大，精准检测细胞凋亡

产品货号：B42321

产品规格：500 μ L

储运条件：4 $^{\circ}$ C避光保存，冰袋运输

产品简介：

磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)是细胞膜磷脂双分子层的重要组成成分，正常状态下主要分布于细胞膜内侧（胞质侧）。当细胞发生早期凋亡时，细胞膜磷脂双分子层结构紊乱，PS外翻至细胞膜外侧，这是细胞凋亡早期的标志性事件。

Annexin V是一种分子量约 35~36 kDa的钙依赖性磷脂结合蛋白，对PS具有高度特异性和亲和力。本产品采用生物素(Biotin)标记 Annexin V，可通过与凋亡细胞表面外翻的PS特异性结合，锚定于凋亡细胞表面；再结合链霉亲和素(Streptavidin)偶联的检测试剂，实现对凋亡细胞的定性或定量检测。同时可联合碘化丙啶(PI)排除坏死细胞，精准区分活细胞、早期凋亡细胞及晚期凋亡/坏死细胞。

注：效能等同于Biotium Annexin V Conjugates (#29013)。

应用范围：细胞凋亡的定性与定量检测；凋亡通路机制及疾病模型验证研究；

产品特点：

- **荧光特异性高**：仅与凋亡细胞表面外翻的 PS 结合，不与活细胞或坏死细胞（无 PS 外翻）非特异性结合；
- **灵敏度高**：可检测早期凋亡细胞，且生物素-链霉亲和素系统可放大信号，提升检测灵敏度；
- **适用性广**：兼容流式细胞术、荧光显微镜等多种检测平台，适用于贴壁细胞、悬浮细胞、原代细胞及组织单细胞悬液。

产品组分：

组分	100 T
Annexin V-Biotin conjugate	500 μ L

注：试剂盒使用次数为进行 96 孔板荧光显微镜检测时可检测的微孔总数。

注意事项：

- 使用贴壁细胞进行实验时，使用胰酶进行消化后的细胞，必须使用含有血清的培养基中和并去除胰酶，否则胰酶将会降解Annexin V，导致染色失败。
- 本实验中不建议使用甲醛固定细胞，Annexin V依赖于正常细胞中的完整细胞膜进行染色。若需固定需添加氯化钙。
- 如果进行流式检测，建议在实验中设置单染色的对照组，流式检测中用于调节补偿。
- 荧光显微镜和流式细胞仪检测时选用的波段或通道，需根据实际选用的链霉亲和素偶联物进行适配
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明：

一、实验前准备

1. 试剂准备：



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
技术咨询 Contact@probelives.com
订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
英文网址 www.probelives.com
Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

- 将试剂从储存条件（如4℃）取出，平衡至室温（15~25℃），准备足量PBS缓冲液。
- 配制Annexin V·Binding·Buffer:10 mM HEPES,140 mM-NaCl,and 2.5·mM CaCl₂, pH 7.4。

注：以下操作步骤中使用的Annexin V Binding Buffer均为1×。

- 本产品操作步骤中的链霉亲和素偶联物以BF™ 488-链霉亲和素为例。

2. 仪器准备：

- 荧光显微镜、流式细胞仪或酶标仪。

3. 对照组设置：（以 Biotin-Annexin V+BF™ 488-链霉亲和素与 PI 进行双染流式检测为例）

组别	Biotin-Annexin V+BF™ 488-链霉亲和素	PI	样品细胞
空白对照	-	-	不做任何处理
阴性对照	+	+	不做任何处理
单阳对照 1	+	-	诱导剂处理后明显凋亡
单阳对照 2	-	+	诱导剂处理后明显凋亡
实验组	+	+	实验组细胞

- 空白对照组：评估背景荧光干扰、检测细胞自身的自发荧光、流式检测中用于调节阈值和电压。
- 阴性对照组：排除染料的非特异性结合，验证染色的特异性。
- 单阳对照组：排除荧光串扰，校准信号强度参数、流式检测中调节补偿。

4. 细胞准备：

- 根据实验设计，对细胞进行相应的药物处理。

二、操作步骤

方案一：荧光显微镜检测（适用于悬浮细胞）

1. 收集与洗涤细胞：

- （1）收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。
- （2）1000 rpm，室温离心 5 min，小心吸弃上清液。

2. 细胞重悬与计数：

- （1）使用 PBS 重悬并细胞计数。
- （2）取 $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 个细胞，1000 rpm 低速离心 5 min，去除 PBS。
- （3）使用 100 μ L Annexin V Binding Buffer 重悬。1000 rpm 低速离心 5 min，去除上清。

注：显微镜法对细胞密度要求不严格，只要实验组与对照组密度一致即可。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整，以显微镜下视野中细胞分布清晰可辨为宜。

3. 细胞染色：

- （1）使用100 μ L Annexin V Binding Buffer重悬细胞，加入5 μ L Biotin-Annexin V，轻轻吹打混匀。
- （2）室温避光孵育 15 min。孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为 15~30 min。
- （3）孵育结束后，1000 rpm，室温离心5 min，收集细胞。
- （4）小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。
- （5）加100 μ L Annexin V Binding Buffer轻柔重悬细胞，进行洗涤，离心，吸净上清液。
- （6）使用100 μ L Annexin V Binding Buffer重悬细胞，加入终浓度为1 μ g/mL的BF™ 488-链霉亲和素，轻轻吹打混匀。
- （7）室温避光孵育15 min。

注：染料的使用量可以根据不同的细胞种类、预实验或实验条件设置的使用量进行调整。

4. 洗涤与重悬：

- （1）孵育结束后，1000 rpm，室温离心 5 min，收集细胞。
- （2）小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。
- （3）加入 100 μ L Annexin V Binding Buffer 轻柔重悬细胞，进行洗涤，离心，吸净上清液。
- （4）加入 100 μ L Annexin V Binding Buffer 轻柔重悬细胞，制成待测样品。

5. 显微镜观察与拍照：



(1) 96孔板法：将100 μ L细胞悬液加入96孔板中，静置片刻，待细胞自然沉降贴底后，置于荧光显微镜下观察。

注：细胞悬液使用量可以根据细胞计数的数量自行调整，显微镜视野中细胞分布 70%~80%为最佳。

(2) 载玻片法：取20~30 μ L细胞悬液滴加于洁净载玻片上，轻轻盖上盖玻片，避免产生气泡，置于荧光显微镜下观察。

(3) 分别在预设的滤光片条件下，寻找并分别拍摄。

方案二：荧光显微镜检测（适用于贴壁细胞）

1. 细胞处理：

(1) 提前一天在孔板中接种细胞，使得细胞汇合度达到70%~80%，待细胞贴壁后按照实验设计处理细胞。

2. 细胞清洗：

(1) 直接在培养板中吸弃细胞培养液。

(2) 根据培养板规格，加入对应体积的Annexin V Binding Buffer轻柔洗涤细胞一次（例如：96孔板加100 μ L/孔，48孔板加150 μ L/孔，24孔板加250 μ L/孔，12孔板加500 μ L/孔，6孔板加1 mL/孔）。洗涤后吸净组分A。

3. 制备染色工作液：

(1) 按照每100 μ L中5 μ L Biotin-Annexin V的使用量将染料加入到Annexin V Binding Buffer中，混匀备用。

(2) 按照终浓度为1 μ g/mL的BFTM 488-链霉亲和素的使用量将染料加入到Annexin V Binding Buffer中，混匀备用。

注：各染料的使用量可以根据不同的细胞种类、预实验或实验条件设置的使用量进行调整。

4. 细胞染色：

(1) 向各孔中加入对应体积的Biotin-Annexin V工作液（体积同步骤1，例如：96孔板加100 μ L/孔，48孔板加150 μ L/孔，24孔板加250 μ L/孔，12孔板加500 μ L/孔，6孔板加1 mL/孔）。

(2) 室温避光孵育15 min。孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为15~30 min。

(3) 孵育结束后，吸弃各孔中的染色工作液。

(4) 按步骤2的体积，加入Annexin V Binding Buffer洗涤细胞。

(5) 向各孔中加入对应体积的BFTM 488-链霉亲和素工作液（体积同步骤1，例如：96孔板加100 μ L/孔，48孔板加150 μ L/孔，24孔板加250 μ L/孔，12孔板加500 μ L/孔，6孔板加1 mL/孔）。

(6) 室温避光孵育15 min。

注：染料的使用量可以根据不同的细胞种类、预实验或实验条件设置的使用量进行调整。

5. 洗涤：

(1) 孵育结束后，吸弃各孔中的染色工作液。

(2) 按步骤2的体积，加入Annexin V Binding Buffer洗涤细胞。

6. 显微镜观察与拍照：

(1) 洗涤后，每孔加入对应体积的Annexin V Binding Buffer，以保持细胞湿润。

(2) 直接将培养板置于荧光显微镜下观察和拍照。

方案三：流式细胞仪检测（适用于悬浮与贴壁细胞）

1. 收集与制备单细胞悬液：

● 悬浮细胞：同方案一，最终取 $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 个细胞。

● 贴壁细胞：

a.将细胞培养基吸出至适合的离心管内备用。贴壁细胞用少量 PBS 清洗一遍，清洗后的 PBS 吸出后同样转移到盛装培养基的离心管内，1000 rpm，室温离心 5 min。

b.加入适量不含 EDTA 的胰酶消化液消化细胞。

注：胰酶使用量、消化时间、消化温度根据各自实验室的经验操作。

c.关键：加入“a 步骤”离心管内备用的细胞培养基，终止消化。

d.将细胞悬液转移至合适的离心管，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清。

e.收集 a 步骤与 d 步骤中的细胞。

f.用 PBS 重悬细胞并进行细胞计数。

g.取 $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 个细胞，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清。

h.100 μ L Annexin V Binding Buffer 清洗细胞，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清。

注：胰酶消化步骤对于贴壁细胞很关键。消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落容易造成机械损伤，导致细胞凋亡的假阳性；消化时间过长，同样会造成细胞凋亡的假阳性，影响细胞膜上 PS 与 Annexin V 的结合干扰细胞凋亡的检测。

2. 细胞染色：



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
技术咨询 Contact@probelives.com
订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
英文网址 www.probelives.com
Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

- (1) 用100 μ L Annexin V Binding Buffer重悬细胞。
- (2) 加入5 μ L Biotin-Annexin V，轻轻吹打混匀。
- (3) 室温避光孵育15 min。孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为15~30 min。
- (4) 孵育结束后，1000 rpm，室温离心5 min，收集细胞。
- (5) 加入100 μ L Annexin V Binding Buffer轻柔重悬，洗涤1次，1000 rpm，室温离心5 min，吸弃上清。
- (6) 加入100 μ L Annexin V Binding Buffer轻柔重悬细胞，加入终浓度为1 μ g/mL的BF™ 488-链霉亲和素，轻轻吹打混匀。
- (7) 室温避光孵育15 min。

注：染料的使用量可以根据不同的细胞种类、预实验或实验条件设置的使用量进行调整。

3. PI 染色（可选）：

- (1) 孵育结束后，1000 rpm，室温离心5 min，收集细胞。
- (2) 加入100 μ L Annexin V Binding Buffer轻柔重悬，洗涤1次，1000 rpm，室温离心5 min，吸弃上清。
- (3) 加入100 μ L Annexin V Binding Buffer轻柔重悬细胞，加入终浓度为5 μ g/mL的PI，轻轻吹打混匀。
- (4) 室温避光孵育5 min。

4. 洗涤与重悬：

- (1) 孵育结束后，1000 rpm，室温离心5 min，收集细胞。
- (2) 加入100 μ L Annexin V Binding Buffer轻柔重悬，洗涤1次，1000 rpm，室温离心5 min，吸弃上清。
- (3) 加入500 μ L Annexin V Binding Buffer轻柔重悬细胞，制成流式上机样品。

5. 上机检测：

- (1) 重要：染色完成后1 h内进行流式检测，以保证荧光信号稳定。
- (2) 用流式细胞仪在预设的检测通道下进行分析。
- (3) 首先通过空白对照（未染色细胞）调节电压，使细胞群位于坐标系左下角。
- (4) 然后检测阴性对照和阳性对照，确认实验体系成立。
- (5) 最后检测实验样品，记录并分析细胞的平均荧光强度。

三、结果判读：

1. 定性分析（显微镜）：

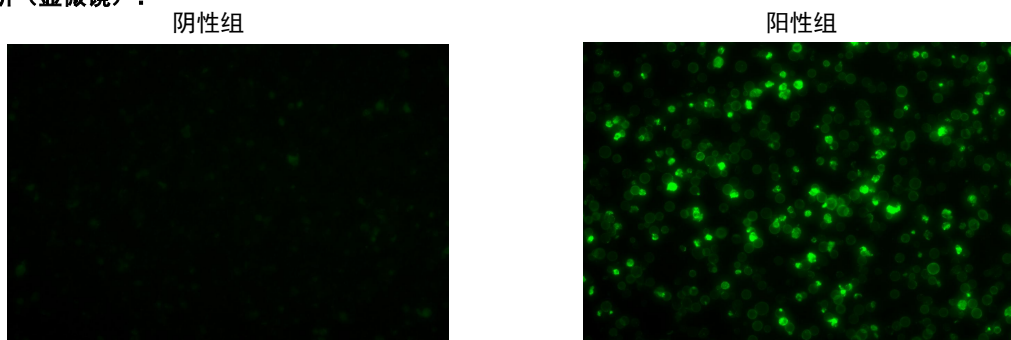


图 1. Biotin-Annexin V/BF™ 488-链霉亲和素标记细胞荧光镜检拍照

- (1) 阴性组：K562正常细胞，进行Biotin-Annexin V/BF™ 488-链霉亲和素标记后荧光镜检拍照。
- (2) 阳性组：诱导凋亡处理后的K562细胞，进行Biotin-Annexin V/BF™ 488-链霉亲和素标记荧光镜检拍照。

结果判读： Biotin-Annexin V标记凋亡细胞后，经BF™ 488-链霉亲和素标记，可激发出绿色荧光。在经过凋亡诱导处理后，与阴性对照相比磷脂酰丝氨酸(PS)外翻水平显著增加（绿色荧光亮度、细胞个数显著增强），表明药物促进了细胞凋亡。

注：实际检测结果可能因检测仪器、操作条件、细胞类型等差异产生不同，本示例仅提供参考。

常见疑问与解答：

● 问：可以在染色前或染色后使用固定细胞吗？

答：要观察凋亡细胞的不同状态，只能用活细胞诱导凋亡后进行检测。如果将细胞进行固定，细胞在固定过程中将全部死亡，染色结果将出现大量的假阳性凋亡或信号。

● 问：使用贴壁细胞进行流式检测时为什么要保留培养细胞的培养基？

答：药物处理后的细胞已经存在凋亡细胞，这些细胞的贴壁能力逐渐降低，会游离在培养基中，染色检测时需将这部分细胞考虑进去，否则检测结果可能凋亡或坏死细胞的比例比较低，对药物效果或者细胞处理效果的评价产生错误判断；且细胞培养基中含有的血清能够高效的中和胰酶，残留的胰酶会降解后续染色过程中的 Annexin V，导致染色失败。

