

## Biotin-X Annexin V Conjugate for Apoptosis Detection

### ——细胞凋亡检测试剂

产品货号	产品名称	包装规格	有效期
A031	Biotin-X Annexin V	25 µg (100 次)	1 年

储存条件：2~6°C，避光保存。

## 产品说明书

GeneCopoeia, Inc.      广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城  
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼  
邮编：510663  
电话：4006-020-200  
邮箱：[sales@igenebio.com](mailto:sales@igenebio.com)  
网址：[www.abpbio.com](http://www.abpbio.com) [www.igenebio.com](http://www.igenebio.com)

## Biotin-X Annexin V Conjugate

产品货号: A031

### 产品介绍

细胞凋亡 (apoptosis) 指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序的死亡。它是细胞正常生理活动的一部分。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, 细胞膜中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 是一种分子量为 35~36 kD 的  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将 Annexin V 进行荧光素 (eGFP, FITC, Andy Fluor) 或生物素标记, 以标记了的 Annexin V 作为荧光探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。

### 注意事项

- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 实验步骤

#### 样品染色

1. a) 悬浮细胞: 300×g, 4℃离心 5 min 收集细胞。  
b) 贴壁细胞: 用不含 EDTA 的胰酶消化后, 300×g, 4℃离心 5 min 收集细胞。(注: 胰酶消化时间不易过长, 否则容易引起假阳性)
2. 准备阳性实验对照组, 使用合适的方法诱导细胞凋亡。同时准备未经凋亡诱导处理的细胞作为阴性实验对照组。
3. 用 4℃预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 每次均需 300×g, 4℃离心 5 min。
4. 配制 1×Annexin-binding buffer: 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, and 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4。
5. 加入 0.5 ml 去离子水溶解 Biotin-X Annexin V 偶合物。
6. 用 1×Annexin-binding buffer 重悬细胞, 调节其浓度为 $\sim 1 \times 10^6$  细胞/ml。
7. 取 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液于 5 ml 流式管中, 加入 5  $\mu\text{l}$  Biotin-X Annexin V 偶合物。建议同时加入 Propidium Iodide (2  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 作为识别死细胞的示踪剂。轻轻混匀。

8. 室温、避光、反应 15 min。
9. 加入 400  $\mu$ l 1 $\times$ Annexin-binding buffer, 轻柔混匀, 300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃上清。
10. 用 100  $\mu$ l 1 $\times$ Annexin-binding buffer 重悬细胞, 加荧光素标记的 Streptavidin, 避光、室温孵育 1 小时。
11. 加入 400  $\mu$ l 1 $\times$ Annexin-binding buffer, 轻柔混匀。请在 1 小时内, 进行下述荧光显微镜或流式细胞仪的观察和检测。

### 荧光显微镜观察

1. 用 1 $\times$ Annexin-binding buffer 洗涤细胞, 300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min。然后用 1 $\times$ Annexin-binding buffer 重悬细胞。
2. 滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上, 并用盖玻片盖上细胞。
3. 对于贴壁细胞来说, 也可直接用盖玻片来培养细胞并诱导细胞凋亡。
  - (1) 将细胞于盖玻片上生长, 用适当的凋亡诱导剂诱导细胞凋亡, 并设立阴性对照组。
  - (2) 用 PBS 洗涤细胞两次。
  - (3) 在 100  $\mu$ l 1 $\times$ Annexin-binding buffer 中加入 5~25  $\mu$ l Biotin-X Annexin V 偶合物, 2  $\mu$ l Propidium Iodide (100  $\mu$ g/ml), 混匀。
  - (4) 将上述溶液滴加于盖玻片表面, 使盖玻片表面均匀覆盖。
  - (5) 避光、室温反应 5~15 min。
  - (6) 用 1 $\times$ Annexin-binding buffer 洗涤细胞两次。
  - (7) 加 100  $\mu$ l 1 $\times$ Annexin-binding buffer, 和荧光素标记的 Streptavidin, 避光、室温孵育 1 小时。
  - (8) 用 1 $\times$ Annexin-binding buffer 洗涤细胞两次。
4. 将盖玻片倒置于载玻片上, 于荧光显微镜下用 FITC 滤光片观察 Biotin-X Annexin V 偶合物荧光信号呈绿色, 用 Texas Red 滤光片观察 PI 荧光信号呈红色。

### 流式细胞仪分析

用流式细胞仪检测, Biotin-X Annexin V 偶合物绿色荧光通过 FITC 通道 (FL1) 检测; PI 红色荧光通过 PI 通道 (FL2 或 FL3) 检测。

荧光补偿调节: 使用未经凋亡诱导处理的正常细胞, 作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重迭和设定十字门的位置。