

Annexin V-mCherry/SYTOX Green 细胞凋亡检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
R32122-20T	Annexin V-mCherry/SYTOX Green 细胞凋亡检测试剂盒	20T
R32122-50T	Annexin V-mCherry/SYTOX Green 细胞凋亡检测试剂盒	50T

产品简介:

源叶生产的 Annexin V-mCherry/SYTOX Green 细胞凋亡检测试剂盒(Cell Apoptosis Detection Kit with Annexin V-mCherry and SYTOX Green)是一种用细胞凋亡荧光探针 Annexin V-mCherry 联合死细胞绿色荧光探针 SYTOX Green 来检测细胞凋亡及坏死的一种试剂盒。可以使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备进行检测。

本试剂盒检测的是 Annexin V-mCherry 红色荧光和 SYTOX Green 的绿色荧光, Annexin V-mCherry 荧光蛋白的最大激发光波长为 587nm, 最大发射光波长为 610nm; SYTOX Green 插入 DNA 后最大激发光波长为 504nm, 最大发射光波长为 523nm。Annexin V-mCherry 和 SYTOX Green 的激发光谱和发射光谱参考图 1。

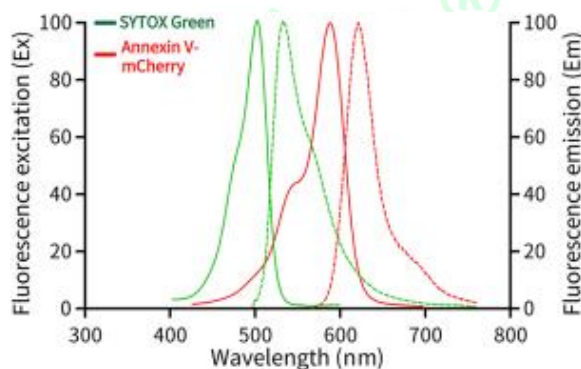


图 1. Annexin V-mCherry 和 SYTOX Green 的激发和发射光光谱。

细胞凋亡(Apoptosis)是生物体发育等生命过程中普遍存在的、由基因决定的细胞主动有序的死亡方式。当细胞遇到内、外环境因子刺激时,启动基因调控的自杀保护措施,去除体内非必需细胞或即将发生特化的细胞。在这一过程中,细胞脱落离体或裂解为若干凋亡小体,并迅速被巨噬细胞或邻近细胞清

除，这是一种由基因控制、高度有序的细胞自主死亡，包含一系列信号事件组成的通路。细胞凋亡失调与多种疾病有关，例如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)和癌症等。

细胞凋亡通过特征性的形态学和生物化学变化而区别于坏死(Necrosis)，包括细胞皱缩、细胞核皱缩、核膜核仁破碎等等。在正常活细胞中，磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine，简称 PS)位于细胞膜的近细胞质面。而在凋亡细胞中，PS 从质膜的内部外翻到细胞表面即细胞膜外侧，从而使 PS 暴露于细胞外部。在白细胞的凋亡过程中，白细胞表面的 PS 标记可以被巨噬细胞识别，从而最终被巨噬细胞吞噬。人血管抗凝血剂 Annexin V 是一种 35-36kDa Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，对 PS 具有高亲和力。用红色荧光蛋白的 mCherry 标记的 Annexin V (Annexin V-mCherry)染色细胞，就可以通过荧光显微镜、激光共聚焦显微镜或流式细胞仪等荧光检测设备非常简单而直接地检测到磷脂酰丝氨酸的外翻这一细胞凋亡的重要特征。需要指出的是对于坏死细胞，由于细胞膜的完整性被破坏，位于细胞膜内侧的 PS 也会被 Annexin V-mCherry 染色。

Annexin 是一类广泛分布于真核细胞细胞浆内钙离子依赖的磷脂结合蛋白，参与细胞内的信号转导。但仅 Annexin V 被报道可以调控一些 PKC 的活性。

Annexin V 选择性结合磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine，简称 PS)。磷脂酰丝氨酸主要分布在细胞膜内侧，即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期，不同类型的细胞都会把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面，即细胞膜外侧。磷脂酰丝氨酸暴露到细胞表面后会促进凝血和炎症反应。而 Annexin V 和外翻到细胞表面的磷脂酰丝氨酸结合后可以阻断磷脂酰丝氨酸的促凝血和促炎症反应活性。

SYTOX Green 是一种非细胞膜渗透性的花菁荧光染料，不能穿过具有生物活性的细胞质膜，只能穿过死细胞膜的无序区域而到达细胞核，并嵌入细胞的 DNA 双螺旋形成 SYTOX Green-DNA 复合物，荧光强度增加 500 倍以上，从而产生明亮的绿色荧光，因此 SYTOX Green 仅能对死细胞染色，从而被用来区分正常细胞与坏死细胞。

Annexin V-mCherry 相比藻红蛋白(Phycoerythrin, 简称 PE)标记的 Annexin V, 激发光谱更窄, 不会像 PE 那样在 495nm 左右产生红色荧光, 非常适合与其它绿色荧光一同检测, 在进行流式检测时几乎不需要进行任何补偿。

本产品使用便捷, 结果清晰。正常细胞不会被 Annexin V-mCherry 和 SYTOX Green 所染色, 凋亡细胞和坏死细胞都会被 Annexin V-mCherry 所染色, 坏死细胞的细胞核被 SYTOX Green 染成明亮的绿色荧光。有报道称, 凋亡中晚期细胞的细胞核被 SYTOX Green 染成较弱的绿色荧光。使用本试剂盒检测细胞凋亡和细胞坏死的效果参考图 2。

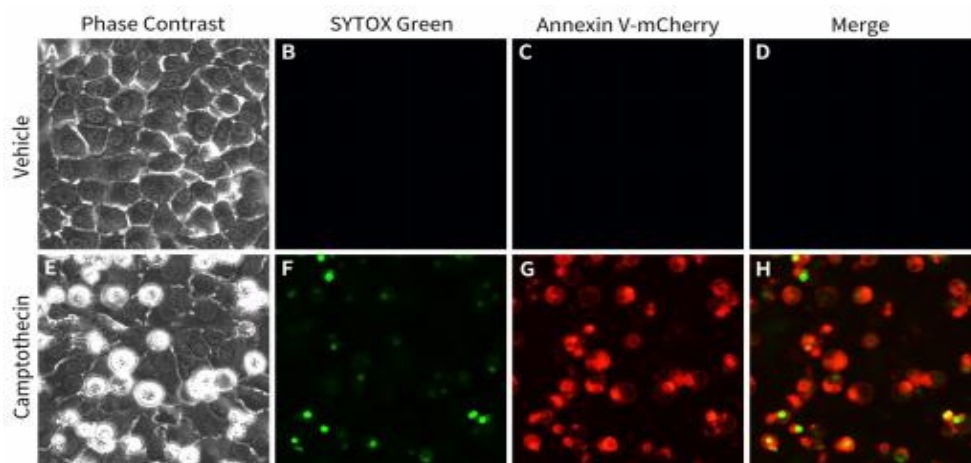


图 2. Annexin V-mCherry/SYTOX Green 细胞凋亡检测试剂盒检测 BGC-823 (人胃癌细胞)细胞凋亡和坏死的效果。正常状态的 BGC-823 细胞在明场下的形态见图 A; 正常细胞不会被 Annexin V-mCherry 和 SYTOX Green 所染色(图 B-D)。Camptothecin 诱导 16 小时后的 BGC-823 细胞在明场下的形态见图 E; 凋亡和坏死细胞的细胞膜呈红色荧光(图 G-H); 凋亡细胞的细胞核成较弱的绿色荧光, 坏死细胞的细胞核呈明亮的绿色荧光(图 F)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异, 本图仅供参考。

一个小包装的本试剂盒 R32122-20T 共可以检测 20 个样品, 中包装的试剂盒 R32122-50T 可以检测 50 个样品。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R32122-20T	Annexin V-mCherry	100μl
	Annexin V-mCherry Binding Buffer	12ml
	SYTOX Green Staining Solution	20μl
—	说明书	1 份



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

产品编号	产品名称	包装
R32122-50T	Annexin V-mCherry	250 μ l
	Annexin V-mCherry Binding Buffer	30ml
	SYTOX Green Staining Solution	50 μ l
—	说明书	1 份

保存条件:

-20°C 保存, 一年有效。

注意事项:

如果有细菌或真菌污染, 会严重影响检测效果。

染色后宜尽快检测, 时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。

如果细胞收集过程中使用了胰酶, 需注意设法去除残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-mCherry, 最终导致染色失败。

荧光物质均易发生淬灭, 在进行荧光观察时, 尽量缩短观察时间, 同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。

需自备 PBS。

本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 对于悬浮细胞:

a. 在进行完细胞凋亡刺激后, 1000 \times g (约 1000-2000rpm)离心 5 分钟, 弃上清, 收集细胞, 用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。注意: PBS 重悬不能省略, PBS 重悬的过程同时也起到了洗涤细胞的作用, 可以保证后续 Annexin V-mCherry 的结合。

b. 取 5-10 万重悬的细胞, 1000 \times g 离心 5 分钟, 弃上清, 加入 194 μ l Annexin V-mCherry Binding Buffer 轻轻重悬细胞。

c. 加入 5 μ l Annexin V-mCherry 和 1 μ l SYTOX Green, 轻轻混匀。

d. 室温(20-25°C)避光孵育 10-20 分钟, 随后置于冰浴中。可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞 2-3 次以改善标记效果。

e. 随即进行流式细胞仪检测, Annexin V-mCherry 为红色荧光, SYTOX Green 为绿色荧光。如果用于荧光显微镜下检测, $1000\times g$ 离心 5 分钟, 收集细胞, 用 50-100 μ l Annexin V-mCherry Binding Buffer 轻轻重悬细胞, 涂片后, 荧光显微镜下观察。注意: 细胞在染色后须尽快完成检测, 通常宜在 1 小时之内完成检测。用于流式细胞仪检测时, 如果发现 AnnexinV-mCherry 单独染色时出现了过多的 SYTOX Green 假阳性细胞, 并且通过调整相关设置和参数也无法改善, 可以用 PBS 将 Annexin V-mCherry 稀释 3-10 倍后再进行检测。

2. 对于贴壁细胞:

a. 把细胞培养液吸出至一合适离心管内, PBS 洗涤贴壁细胞一次, 加入适量胰酶细胞消化液(可含有 EDTA)消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时, 吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化。

b. 加入步骤 2a 中收集的细胞培养液, 稍混匀, 转移到离心管内, $1000\times g$ 离心 5 分钟, 弃上清, 收集细胞, 用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。注意: 加入步骤 2a 中的细胞培养液一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞, 另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解后续加入的 Annexin V-mCherry 导致染色失败。

c. 取 5-10 万重悬的细胞, $1000\times g$ 离心 5 分钟, 弃上清, 加入 194 μ l Annexin V-mCherry Binding Buffer 轻轻重悬细胞。

d. 加入 5 μ l Annexin V-mCherry 和 1 μ l SYTOX Green, 轻轻混匀。

e. 室温(20-25 $^{\circ}$ C)避光孵育 10-20 分钟, 随后置于冰浴中。可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞 2-3 次以改善标记效果。

f. 随即进行流式细胞仪检测, Annexin V-mCherry 为红色荧光, SYTOX Green 为绿色荧光。如果用于荧光显微镜下检测, $1000\times g$ 离心 5 分钟, 收集细胞, 用 50-100 μ l Annexin V-mCherry Binding Buffer 轻轻重悬细胞, 涂片后, 荧光显微镜下观察。注意: 细胞在染色后须尽快完成检测, 通常宜在 1 小时之内完成检测。用于流式细胞仪检测时, 如果发现 AnnexinV-mCherry 单独染色时出现了过多的 SYTOX Green 假阳性细胞, 并且通过调整相关设置



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

和参数也无法改善，可以用 PBS 将 Annexin V-mCherry 稀释 3-10 倍后再进行检测。

3. 对于贴壁细胞的原位荧光显微镜检测：

注：本方法的优点是可以原位观察细胞凋亡，缺点是部分凋亡由于不贴壁而检测不到。

- a. (选做)如果条件许可，把细胞培养于 24 孔板、48 孔板或 96 孔板内。在凋亡诱导结束后，用可以对多孔板进行离心的离心机 1000×g 离心 5 分钟。
- b. 吸除细胞培养液，加入 PBS 洗涤一次。如果条件许可，在吸除 PBS 前 1000×g 离心 5 分钟。
- c. 加入 194μl Annexin V-mCherry Binding Buffer。
- d. 加入 5μl Annexin V-mCherry 和 1μl SYTOX Green，轻轻混匀。
- e. 室温(20-25℃)避光孵育 10-20 分钟。可以使用铝箔进行避光。
- f. 随即在荧光显微镜下观察，Annexin V-mCherry 为红色荧光，SYTOX Green 为绿色荧光。注意：细胞在染色后须尽快完成检测，通常宜在 1 小时之内完成检测。