

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

产品编号	产品名称	包装
C1070S	Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1070M	Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒	50次

### 产品简介:

- 碧云天生产的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。

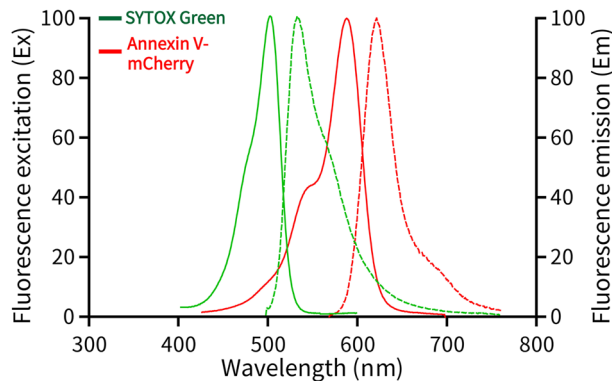


图1. Annexin V-mCherry和SYTOX Green的激发和发射光光谱。

- 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，细胞脱离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。

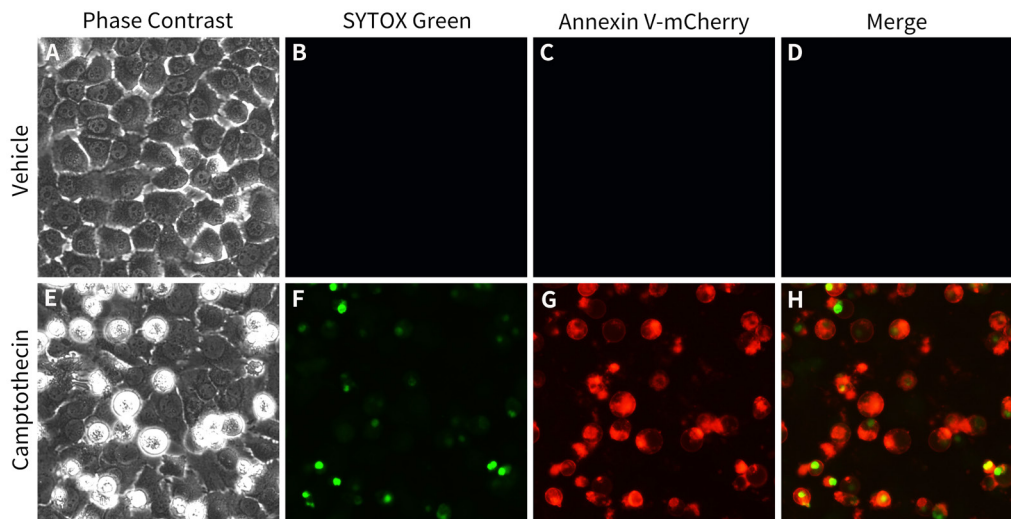


图2. Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒检测BGC-823 (人胃癌细胞)细胞凋亡和坏死的效应。正常状态的BGC-823细胞在明场下的形态见图A；正常细胞不会被Annexin V-mCherry和SYTOX Green所染色(图B-D)。Camptothecin诱导16小时后的BGC-823细胞在明场下的形态见图E；凋亡和坏死细胞的细胞膜呈红色荧光(图G-H)；凋亡细胞的细胞核成较弱的绿色荧光，坏死细胞的细胞核呈明亮的绿色荧光(图F)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异，本图仅供参考。

➤ 一个小包装的本试剂盒C1070S共可以检测20个样品，中包装的试剂盒C1070M可以检测50个样品。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C1070S-1	Annexin V-mCherry	100μl
C1070S-2	Annexin V-mCherry Binding Buffer	12ml
C1070S-3	SYTOX Green Staining Solution	20μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1070M-1	Annexin V-mCherry	250μl
C1070M-2	Annexin V-mCherry Binding Buffer	30ml
C1070M-3	SYTOX Green Staining Solution	50μl
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。Annexin V-mCherry和SYTOX Green Staining Solution避光保存。

#### 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×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×g离心5分钟，弃上清，加入194μl Annexin V-mCherry Binding Buffer轻轻重悬细胞。
- c. 加入5μl Annexin V-mCherry和1μl 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×g离心5分钟, 收集细胞, 用50-100μl 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Annexin V-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:

- 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。
- 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×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。
- 取5-10万重悬的细胞, 1000×g离心5分钟, 弃上清, 加入194μl Annexin V-mCherry Binding Buffer轻轻重悬细胞。
- 加入5μl Annexin V-mCherry和1μl SYTOX Green, 轻轻混匀。
- 室温(20-25℃)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。
- 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×g离心5分钟, 收集细胞, 用50-100μl 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Annexin V-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。

## 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。

- (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。
- 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。
- 加入194μl Annexin V-mCherry Binding Buffer。
- 加入5μl Annexin V-mCherry和1μl SYTOX Green, 轻轻混匀。
- 室温(20-25℃)避光孵育10-20分钟。可以使用铝箔进行避光。
- 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。

## 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C1052	细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1056	细胞凋亡与坏死检测试剂盒	100次
C1062S	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1062M	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1062L	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	100次
C1065S	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1065M	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1065L	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	100次
C1067S	Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1067M	Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1069S	Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1069M	Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1069L	Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	100次
C1070S	Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1070M	Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1071S	线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1071M	线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1073S	活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	20次
C1073M	活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	50次

C1075S	膜通透性细胞凋亡与坏死检测试剂盒	50次
C1075M	膜通透性细胞凋亡与坏死检测试剂盒	200次
C1077S	活细胞Caspase-3活性与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1077M	活细胞Caspase-3活性与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒	50次
C2015M	Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	500次
C1086	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	20次
C1088	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	50次
C1089	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	20次
C1090	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	50次
C1091	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	20次
C1098	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	50次

Version 2020.07.09