

Caspase 3/7 and Annexin V Double Staining Apoptosis Kit

Cat. No: E-CK-A831

Size: 20 Assays/100 Assays

产品编号	产品名称	20 Assays	100 Assays	Storage
E-CK-A483	Caspase 3/7 Substrates (Green) (1mM)	20 μ L	100 μ L	2~8°C, shading light
E-CK-A117	Annexin V-APC Reagent	100 μ L	500 μ L	2~8°C, shading light
E-CK-A151	Annexin V Binding Buffer (10 \times)	1.4 mL \times 2	11 mL	2~8°C
	说明书		一份	

保存条件

2~8°C避光保存 1 年。Annexin V-APC Reagent 禁止冷冻保存。

实验原理

Elabscience®自主研发的 Caspase 3/7 and Annexin V Double Staining Apoptosis Kit 可用于悬浮细胞和贴壁细胞实时监测活细胞中 Caspase3/7 酶活性和细胞凋亡情况。

Caspase 3/7 Substrates (Green)采用新型的具有细胞膜通透性的 Caspase 3/7 绿色荧光底物,可实时检测活细胞中 Caspase 3/7 酶的活性,且不会抑制细胞的凋亡进程。染色的细胞呈绿色荧光,可用流式细胞仪 FL1 或 FITC 检测通道检测,也可使用荧光显微镜 488nm 激发波长进行观测分析。

Annexin V 是一种钙离子依赖性磷脂结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸 (PS) 有高度亲和力。当细胞发生凋亡时,膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻到膜表面,而被荧光染料 APC 标记的 Annexin V 结合,使细胞呈红色荧光,可通过流式细胞仪或荧光显微镜进行检测。

Caspase 3/7 Substrates (Green)和 Annexin V-APC Reagent 共同染色凋亡细胞,可实时检测细胞凋亡进程中细胞内 Caspase 3/7 酶活和细胞表面磷脂酰丝氨酸的动态变化。

检测样本类型

√贴壁细胞

√悬浮细胞

自备试剂及仪器

1) 试剂

PBS 缓冲液、细胞培养基

2) 仪器

流式细胞仪、荧光显微镜

试剂准备

提前取出避光保存的 Caspase 3/7 Substrates (Green), 室温解冻后, 涡旋混匀。

1 \times Annexin V Binding Buffer 配制: 取 1 mL Annexin V Binding Buffer (10 \times) 加入 9 mL 去离子水中混匀。1 \times Annexin V Binding Buffer 可 4°C 冰箱保存, 避免长菌, 1 年有效。

For Research Use Only

实验操作

➤ 流式细胞仪检测

- (1) 收集细胞, 250 g 离心 5 min, 去上清, 加入 1 mL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 250 g 离心 5 min, 去上清。
- (2) 每组 $1\sim 5 \times 10^5$ 个细胞加入 200 μL 1 \times Annexin V Binding Buffer 重悬细胞沉淀, 同时加入 1 μL Caspase 3/7 Substrates (Green) 和 2 μL Annexin V-APC Reagent, 轻轻吹打混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20~30 min。
- (3) 孵育完成后, 无需洗涤, 可以直接使用流式细胞仪进行检测。(Caspase 3/7 可用 FL1 或 FITC 检测通道, Annexin V 可用 APC 检测通道。)

注: 染色后的细胞注意避光, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱或冰浴, 并在 1h 内上机检测, 避免放置时间过久, 活细胞的状态变差, 引起实验条件外的异常凋亡情况。

➤ 荧光显微镜检测

- (1) 小心吸除贴壁细胞的培养基, 每孔加入适量 PBS 洗涤细胞, 去除 PBS, 重复洗涤 1 次, 吸除 PBS。
- (2) 使用 1 \times Annexin V Binding Buffer, 按照 96 孔板每孔 100 μL 或 24 孔板每孔 200 μL 的比例计算反应液总体积, 并按照下表配制足量染色工作液, 轻轻吹打混匀。

组分	1 \times Annexin V Binding Buffer	Caspase 3/7 Substrates (Green) (1 mM)	Annexin V-APC Reagent
染色工作液 200 μL	200 μL	1 μL	2 μL
染色工作液 1 mL	1000 μL	5 μL	10 μL
染色工作液 2 mL	2000 μL	10 μL	20 μL

- (3) 贴壁缓慢加入染色工作液, 轻轻晃动培养板, 使染色液充分浸润细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20~30 min。
- (4) 孵育结束后, 无需洗涤, 可直接在荧光显微镜下观察染色效果。(Caspase 3/7 为绿色荧光, Ex/Em=490nm/535nm; Annexin V 为红色荧光, Ex/Em=650nm/660nm)
- (5) 若是悬浮细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20~30 min 后, 无需洗涤, 250g 离心 5 min, 吸出部分上清, 留取约 10~20 μL 上清终体积, 轻轻吹打混匀细胞, 吸取细胞悬液滴加在载玻片上, 轻轻盖上盖玻片即可在显微镜下观察拍照。

注: 染色后的细胞注意避光, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱或冰浴, 并在 1h 内拍照检测, 避免放置时间过久, 活细胞的状态变差, 引起实验条件外的异常凋亡情况。

结果展示

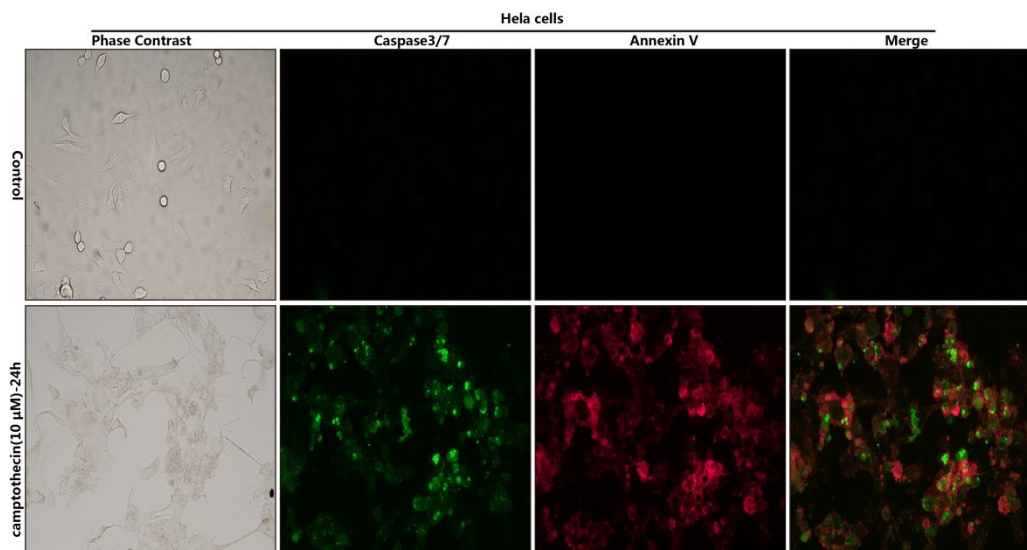


图 1: 10 μM 的 camptothecin 诱导 HeLa 细胞 24h 后, 使用 Caspase 3/7 and Annexin V Double Staining Apoptosis Kit 染色后使用荧光显微镜拍照, Caspase 3/7 染色结果为绿色, 展示发生凋亡并激活 caspase 3/7 酶活的凋亡细胞; Annexin V 染色为红色, 展示早凋和晚凋中发生磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻的凋亡细胞。

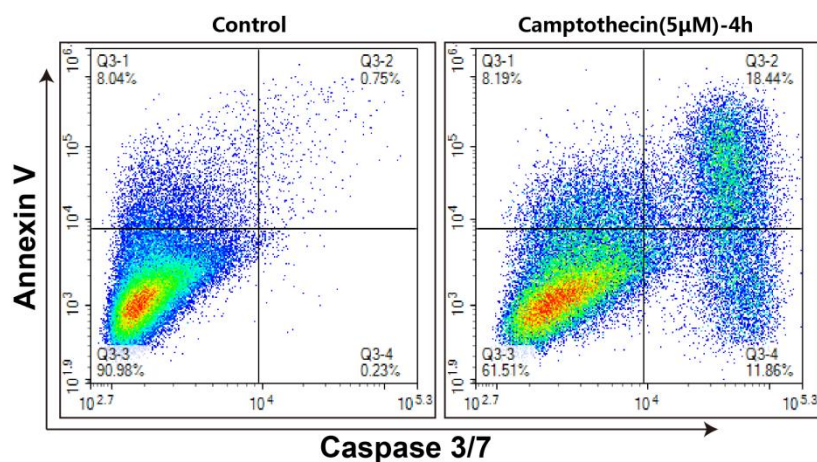


图 2: MOLT-4 细胞用 5 μM 的 camptothecin (右) 或未加药(左) 处理 4 h, 本试剂盒染色后流式检测。Annexin V 单阳细胞 (Q3-1) 为发生 PS 外翻的早凋细胞, Annexin V 和 Caspase 3/7 双阳细胞 (Q3-2) 为早中晚期 Caspase 3/7 活性较高的凋亡细胞, Annexin V 和 Caspase 3/7 双阴细胞 (Q3-3) 为未发生凋亡的活细胞, Caspase 3/7 单阳细胞 (Q3-4) 为发生 Caspase 3/7 酶激活的早凋细胞。

注意事项

1. 本产品仅限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。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 该 Caspase 3/7 Substrates (Green) 荧光探针和 Annexin V 共染色判断活细胞的凋亡进程时, 需要在活细胞状态染色并检测, 不能对细胞进行固定。
4. 应尽量避免消化贴壁细胞带来的机械损伤。同时, 胰酶的消化液中应尽量不含 EDTA, 因为 EDTA 会影响 Annexin V 与磷脂酰丝氨酸的结合。
5. 如果使用含 EDTA 的胰酶, 收集细胞后应充分清洗, 确保 EDTA 被去除干净。
6. 离心机升速和降速过高会引起细胞的损失, 建议调整升速不大于 3, 降速不大于 2, 即 $\text{Acc} \leq 3$, $\text{Dec} \leq 2$ 。

For Research Use Only