

线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
R33037-20T	线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	20T
R33037-50T	线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	50T

产品简介:

源叶生产的线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒(Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis Detection Kit with Mito-Tracker Red CMXRos and Annexin V-FITC)是一种联合使用线粒体膜电位依赖性的红色荧光探针 Mito-Tracker Red CMXRos(也称 MitoTracker Red CMXRos)和细胞凋亡绿色荧光探针 Annexin V-FITC 来检测培养细胞的线粒体膜电位和细胞凋亡的红绿荧光双染试剂盒。红色荧光标记的是保持线粒体膜电位的活细胞,而绿色荧光标记的是发生了凋亡或坏死的细胞。同时试剂盒还提供了用于细胞核荧光染色的 Hoechst 33342 染色液,便于在有需要的时候同时通过细胞核的碎裂和致密浓染等从形态学上观察细胞凋亡。

本试剂盒使用便捷,结果清晰。本产品同时检测线粒体膜电位变化和磷脂酰丝氨酸外翻两个重要的凋亡检测指标。本试剂盒检测后,活细胞绿色荧光阴性,但红色荧光阳性;而凋亡细胞绿色荧光阳性,同时红色荧光显著减弱或者呈现阴性,活细胞和死细胞的红绿荧光对比非常鲜明(参见图 1),可以使用荧光显微镜、流式细胞仪或其它荧光检测设备进行检测。需要指出的是,红色荧光染色在诱导凋亡或坏死后会逐渐减弱,但部分红色荧光减弱的细胞不一定绿色荧光染色阳性。需要指出的是,磷脂酰丝氨酸外翻是细胞凋亡的早期事件,在凋亡早期不一定会出现细胞核碎裂或致密浓染等细胞凋亡时细胞核的形态学变化。

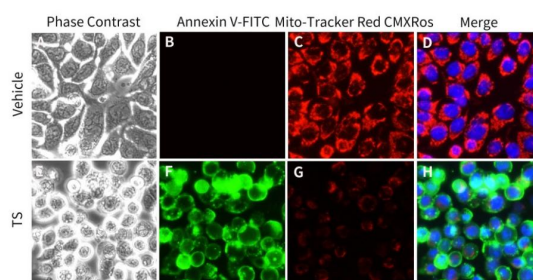


图 1. 本试剂盒检测正常细胞、凋亡细胞的效果。Vehicle 组为正常培养的 HT-29(人结肠癌细胞)细胞, 细胞能被线粒体红色荧光探针 Mito-Tracker Red CMXRos 染色, 但 Annexin V-FITC 绿色荧光染色阴性; HT-29 细胞经过 $\text{TNF } \alpha$ +SM-164(TS)处理 5 小时后, 一些凋亡的细胞绿色荧光呈现阳性, 同时红色荧光显著减弱或者呈现阴性。图中的蓝色荧光为 Hoechst 33342 染色。 $\text{TNF } \alpha$ +SM-164 是一种细胞凋亡诱导试剂盒。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异, 本图仅供参考。

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。用带有绿色荧光的 FITC 标记的 Annexin V (Annexin V-FITC)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-FITC 染色。

Mito-Tracker Red CMXRos (线粒体红色荧光探针)是一种具有细胞通透性的 X-rosamine 衍生物(Chloromethyl-X-rosamine, 简称 CMXRos), 能够特异性地标记细胞中具有生物活性的线粒体。对于正常细胞, Mito-Tracker Red CMXRos 可

以把其中的线粒体染色为明亮的红色荧光，而当细胞发生凋亡等时，线粒体膜电位下降，此时线粒体的红色荧光会逐渐减弱，甚至呈现红色荧光阴性。

本试剂盒检测的是 Mito-Tracker Red CMXRos 的红色荧光和 Annexin V-FITC 的绿色荧光。同时本试剂盒提供 Hoechst 33342，Hoechst 33342 是一种具有细胞膜通透性的蓝色荧光染料，对细胞的毒性较低，是一种优秀的活细胞细胞核染料。Hoechst 33342、Annexin V-FITC 和 Mito-Tracker Red CMXRos 的激发光谱和发射光谱参考图 2。

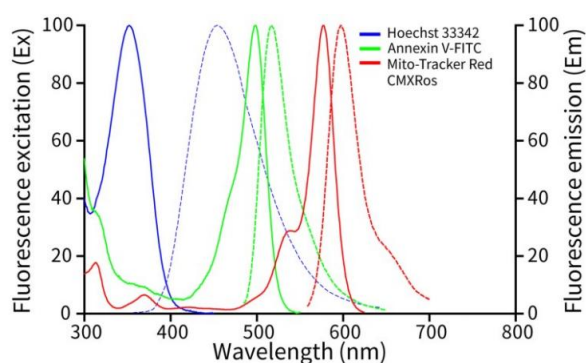


图 2. Hoechst 33342、Annexin V-FITC 和 Mito-Tracker Red CMXRos 的激发光谱与发射光谱。

本试剂盒小包装可以检测 20 个样品，中包装可以检测 50 个样品。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
R33037-20T	Mito-Tracker Red CMXRos 染色液	50μl
	Annexin V-FITC	100μl
	Annexin V-FITC 结合液	12ml
	Hoechst 33342 染色液	100μl
——	说明书	一份

产品编号	产品名称	包装
R33037-50T	Mito-Tracker Red CMXRos 染色液	11μl
	Annexin V-FITC	250μl
	Annexin V-FITC 结合液	30ml
	Hoechst 33342 染色液	250μl
——	说明书	一份



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

保存条件:

-20°C 保存, 一年有效。

注意事项:

尽管经测试 Annexin V-FITC 反复冻融 5 次对于其检测效果无显著影响, 但为取得良好的使用效果, 3-6 个月内推荐 4°C 保存, 并适当注意避免反复冻融。

如果细胞有细菌或真菌污染, 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。残留的胰酶可能会降解 Annexin V-FITC, 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。

用于流式细胞仪检测时, 如果发现 Annexin V-FITC 信号过强, 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-FITC 稀释 3-10 倍后再进行检测。

需自备 PBS 或 HBSS。

Mito-Tracker Red CMXRos 染色液和 Hoechst 33342 染色液对人体有害, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。

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, 1000g 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-FITC 的结合。

b. 取 5-10 万重悬的细胞, 1000g 离心 5 分钟, 弃上清, 加入 188μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。



c. 加入 2 μ l Mito-Tracker Red CMXRos 染色液、5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l Hoechst 33342 染色液，轻轻混匀。注意：Hoechst 33342 染色液可以选择性加入，不加入也是可以的。

d. 室温(20-25 $^{\circ}$ C)避光孵育 20-30 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 次以改善染色效果。

e. 如果用于流式细胞仪检测，可立即上机检测，Mito-Tracker Red CMXRos 为红色荧光(Ex/Em:579/599nm)，Annexin V-FITC 为绿色荧光(Ex/Em:492/520nm)，Hoechst 33342 为蓝色荧光(Ex/Em:350/461nm)，很多时候流式检测仪检测红色和绿色荧光即可，也可以同时检测红绿蓝三色荧光。如果用于荧光显微镜检测，1000g 离心 5 分钟，收集细胞，用 50-100 μ l Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞，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；荧光探针的浓度可以根据具体的染色效果进行适当调整，以获得更好的染色效果；荧光显微镜检测或流式细胞仪检测时，都可以不加入 Hoechst 33342 染色液。

2. 对于贴壁细胞的消化后检测：

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。

注意：对于贴壁细胞，胰酶消化步骤很关键。胰酶消化时间如果过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤；消化时间如果过长，同样易造成细胞膜损伤，甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-FITC 的结合从而干扰对于细胞凋亡的检测。同时，胰酶细胞消化液中应尽量不含 EDTA，因为 EDTA 可能会影响 Annexin V 与磷脂酰丝氨酸的结合。

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，1000g 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



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

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-FITC 导致染色失败。

c. 取 5-10 万重悬的细胞，1000g 离心 5 分钟，弃上清，加入 188μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。

d. 加入 2μl Mito-Tracker Red CMXRos 染色液、5μl Annexin V-FITC 和 5μl Hoechst 33342 染色液，轻轻混匀。注意：Hoechst 33342 染色液可以选择性加入，不加入也是可以的。

e. 室温(20-25°C)避光孵育 20-30 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 次以改善染色效果。

f. 如果用于流式细胞仪检测，可立即上机检测，Mito-Tracker Red CMXRos 为红色荧光 (Ex/Em:579/599nm)，Annexin V-FITC 为绿色荧光 (Ex/Em:492/520nm)，Hoechst 33342 为蓝色荧光(Ex/Em:350/461nm)，很多时候流式检测仅检测红色和绿色荧光即可，也可以同时检测红绿蓝三色荧光。如果用于荧光显微镜检测，1000g 离心 5 分钟，收集细胞，用 50-100μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞，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；荧光探针的浓度可以根据具体的染色效果进行适当调整，以获得更好的染色效果；荧光显微镜检测或流式细胞仪检测时，都可以不加入 Hoechst 33342 染色液。

3. 对于贴壁细胞的原位荧光检测：

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 1000g 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 1000g 离心 5 分钟。

c. 加入 188μl Annexin V-FITC 结合液。

d. 加入 5μl Annexin V-FITC，轻轻混匀。



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

e. 加入 2 μ l Mito-Tracker Red CMXRos 染色液和 5 μ l Hoechst 33342 染色液，轻轻混匀。注意：Hoechst 33342 染色液可以选择性加入，不加入也是可以的。

f. 室温(20-25 $^{\circ}$ C)避光孵育 20-30 分钟，随后置于冰浴中。可以使用铝箔进行避光。

g. 随即在荧光显微镜下观察，Mito-Tracker Red CMXRos 为红色荧光，Annexin V-FITC 为绿色荧光，Hoechst 33342 为蓝色荧光。

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。荧光显微镜检测时，也可以不加入 Hoechst 33342 染色液。

