

BD 凋亡筆記本帶您進入

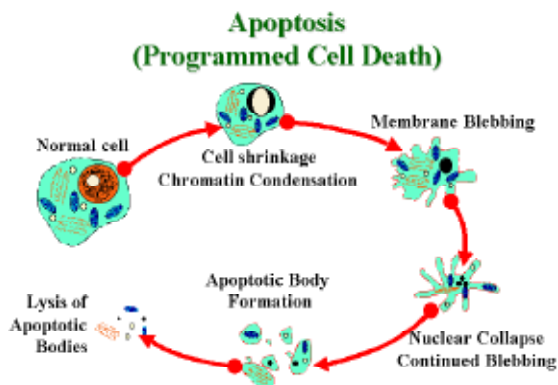
細胞黑暗世界!

源起

凋亡一詞是1972年由澳大利亞病理學家John Kerr首先提出來，本意是花瓣或是樹葉從花或樹上掉落或凋落。而Kerr借用他來描述一種特殊類型的死亡。1965年Kerr及其同事結紮大鼠門脈左支，數小時內大鼠肝左葉開始出現片狀壞死，但周邊部分仍然由肝動脈供血而存活。數週後存活細胞開始變小、變圓、皺縮，細胞膜將包漿及斷裂的染色質分割包圍成緻密的顆粒，以後被周圍的細胞吞噬分解，在細胞死亡的過程中始終保持細胞膜的完整性直到被吞噬消化為止，而且並未在局部發現發炎細胞浸潤。隨後進行了深入研究，終於在1972年將這種細胞死亡現象歸為一種新式的死亡細胞類型-凋亡。

形態學特徵

凋亡細胞最特別的型態特徵是胞核染色質的降解，染色質會聚集於核膜下，成緻密的團塊狀，在一般或電子顯微鏡下觀察可見。染色質的濃極可能是細胞核內DNA裂解的結果，DNA雙鏈發生裂解，先形成約300bp大小的片段，爾後再進一步裂解成180-200bp的核小體，此小體是細胞凋亡的特異性標誌。在尚未形成核小體之前，凋亡細胞會喪失微絨毛、偽足等胞膜結構，細胞變圓等外觀上的變化；隨後，細胞會皺縮，胞質濃縮，最後細胞會裂解形成凋亡小體，被巨噬細胞識別並清除之。這種死亡的過程中，不發生胞器及胞膜的破裂，沒有內含物的外泄，故不引起癌症反應及周圍組織的次級損害。



更勝
死亡筆記本



4大系列 BD凋亡小天使 告訴你的細胞是如何掛點!

使用方法

Plasma
Membrane
Alteration

Mitochondrial
Changes

Caspase
Activation

DNA
Fragmentation

凡購買本期BD凋亡系列產品

滿 3萬 送 5萬

3000 BD 商品禮卷
加贈神祕小禮物喔
5000 BD 商品禮卷
BD 商品禮卷可於下次購買時抵用喔!

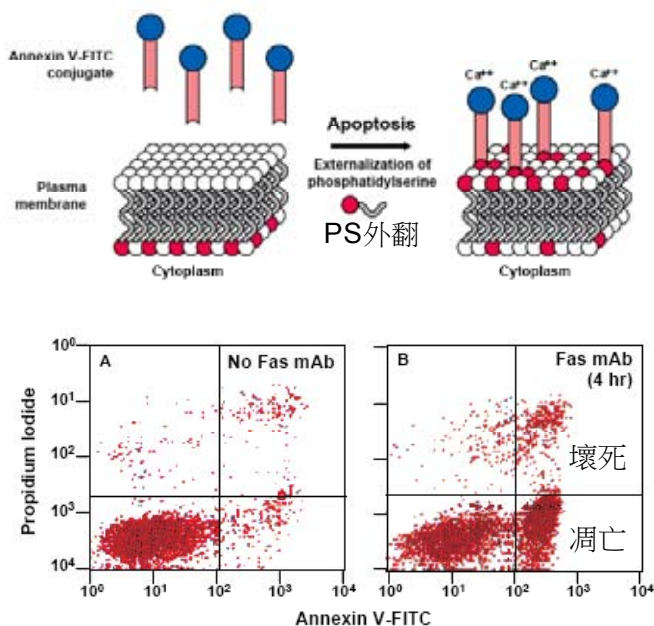
偵測細胞凋亡的第一步

細胞膜 PS 外翻 **VS** Annexin V

Plasma Membrane Alterations - Annexin V

細胞凋亡早期改變發生在細胞膜表面，這些細胞膜表面改變之一是Phosphatidyl Serine (PS) 磷脂從細胞膜內轉移到細胞膜外，使PS暴露在細胞膜外面。PS是一種帶負電荷的磷脂，正常生理情況下它主要存在於細胞膜的內面。在細胞發生凋亡時，細胞膜上的這種磷脂分布的不對稱性被破壞而使PS暴露在細胞膜外。

Annexin V 是一種Ca⁺⁺依賴的磷脂結合蛋白，最初發現是一種具有很強抗凝血特性的血管蛋白。Annexin V 具有易與磷脂類(如 PS)結合的特性，對PS有高度的親合性。因此該蛋白可作為一敏感的探針來檢測暴露在細胞膜表面的PS(如圖所示)。然而PS轉移到細胞膜外不是凋亡所獨特的，也可以發生在壞死細胞上。兩種細胞死亡方式間的差別是在細胞凋亡的初始階段細胞膜是完好的，而壞死的細胞在其早期階段細胞膜的完整性就遭到破壞。因此Annexin V 檢測法多搭配7-AAD或PI 染料，因為活細胞或是細胞膜完整的細胞可將染料排斥在外，達到分辨壞死細胞與凋亡細胞目的。



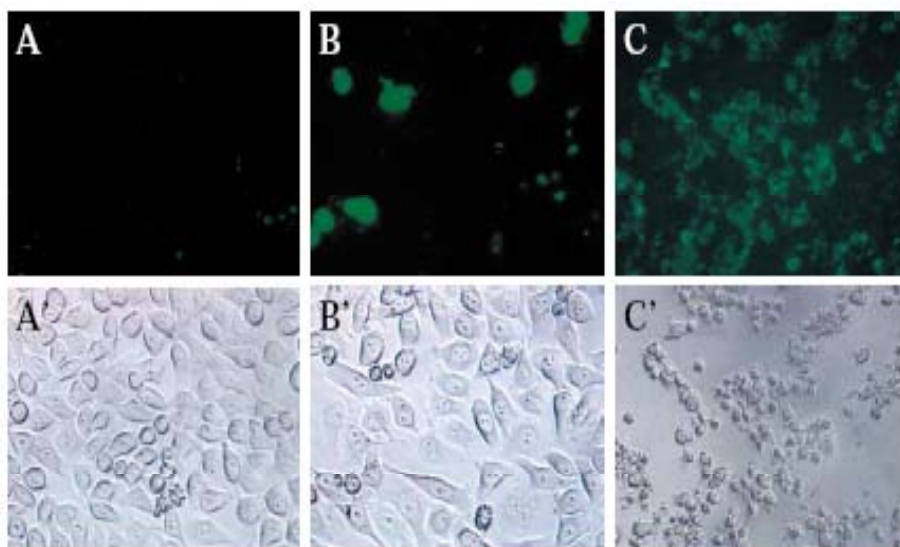
Description	APPS	Size	Cat. No.
Annexin V FITC Apoptosis kit I	Flow cytometry	100 tests	556547
Annexin V PE Apoptosis kit	Flow cytometry	100 tests	559763
Contents: Annexin V-FITC/PE; Propidium Iodide Staining Solution; 10X Binding Buffer			
Propidium Iodide (PI)	Flow cytometry	2 ml	556463
7-AAD	Flow cytometry	2 ml	559925
CD95 (Fas/APO-1)	Flow cytometry	0.5 mg	554254

Annexin V

Fluorescence Microscopy

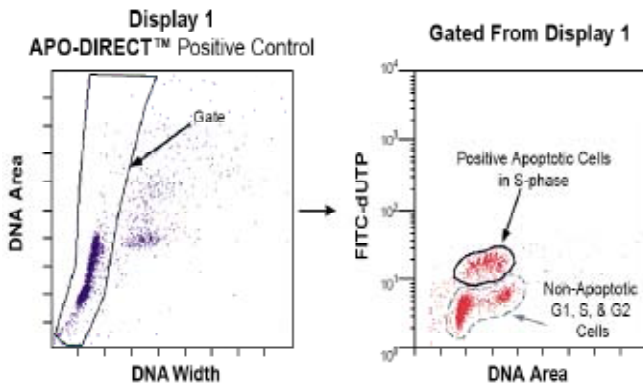
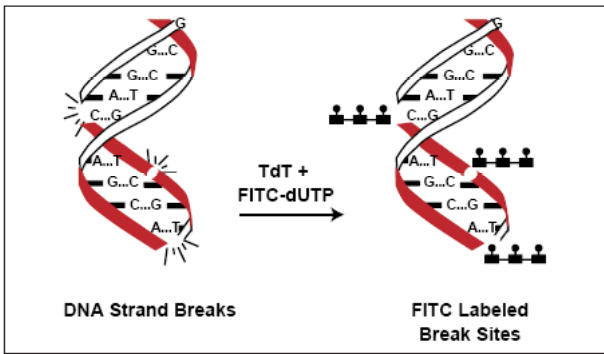
以螢光顯微鏡檢測經 *Hela cell* 藥物處理後 Annexin-V 的表現

(A)沒有加藥處理 (B) 8 μ M camptothecin, 處理 24 h (C) 1 μ M, staurosporine 處理 4 h。A', B', 和 C' 分別代表 A, B 和 C 相位差圖。Annexin-V-FITC 的染色是依照說明書的指示。由螢光表現可以知道 staurosporine 處理過的細胞較 camptothecin 有更多凋亡細胞的表現。此外，對照細胞型態的改變，也可發現凋亡的變化。



Description	APPS	Size	Cat. No.
Annexin V FITC Microscopy kit	Fluorescence Microscopy	25 slides	550911
Contents: Annexin V-FITC, Annexin V Binding Buffer, and PBS Buffer			

DNA Fragmentation



Flow cytometry

細胞凋亡時，DNA被內源性核酸內切酶降解，產生帶有3'末端的切口、或斷裂DNA片段，在TdT作用下使標有螢光色素的特殊甘核酸，如FITC-dUTP，連接到DNA片段的3'末端，螢光強度與DNA片段含量成正比，根據螢光強度對凋亡細胞做出定量分析。該方法亦可配合PI染色進行雙參數分析，除了可得知檢體中凋亡細胞百分比，亦可同時瞭解凋亡細胞所在的細胞週期(G0/G1,S,G2/M)。

以 APO-Direct 試劑組內陽性細胞分析DNA斷裂情形

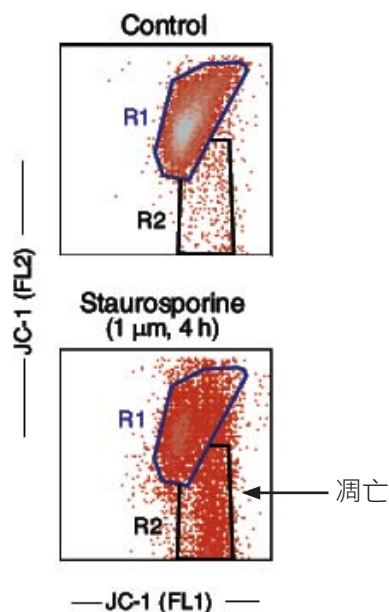
PI染色可以看出細胞週期，DNA Area代表DNA含量，DNA Width代表細胞寬度
相同含量DNA，細胞寬度大兩倍，代表兩個細胞黏在一起(雙連體)，分析細胞週期時須排除雙連體的干擾。從DNA width和 DNA Area的點圖中先圈選出沒有雙連體的細胞群，再進一步分析這類細胞中凋亡的情形。如右圖所示，凋亡細胞主要在S期。

Description	APPS	Size	Cat. No.
Apo-Direct Apoptosis Detection kit	Flow cytometry	50 tests	556381

Contents:FITC-dUTP, PI/RNase Staining Buffer, Reaction Buffer, Rinsing Buffer, Wash Buffer, TdT Enzyme, Negative Control Cells, Positive Control Cells

Mitochondrial Membrane Potential $\Delta\Psi_m$

Jurkat T Cells



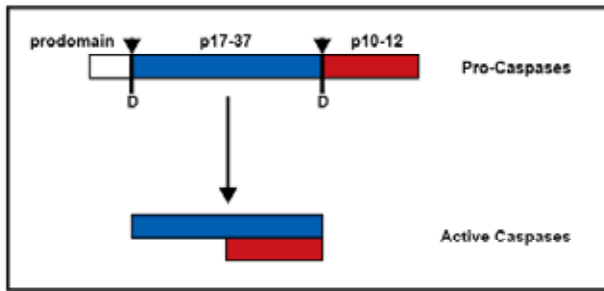
Flow cytometry

越來越多的證據顯示，Mitochondria在細胞凋亡的過程中扮演重要的角色，其中早期證據之一在於粒線體膜電位的改變，去極化的過程(depolarization)會增加細胞膜的通透性並使膜內的蛋白，如Cytochrome C, AIF, Smac/DIABLO等分子釋放到細胞質中，並引發Procaspase-9的活化，造成一連串凋亡的反應。BD公司提供粒線體特異性染料 JC-1，可以用來反應粒線體負電性的高低。JC-1有兩種不同的存在形式，分別為單體(Monomer)或多聚體(Aggregates)，在正常生理狀態下，粒線體負電性高，JC-1多以多聚體存在，發散出且紅且綠的螢光，在FL2可以偵測到大量表現。JC-1多聚體型態是可逆的。當走向凋亡時，粒線體去極化產生，負電性降低時，則以單體存在，在FL1可以觀察綠色螢光的增加。

Description	APPS	Size	Cat. No.
BD MitoScreen JC-1 kit	Flow cytometry	100 tests	551302

Contents:JC-1 Dye and Assay Buffer

Activation of Caspases



Caspase (Cysteine aspartate proteases)的發現源至於以線蟲自殺基因(ced-3, cde4)在人類cDNA基因庫搜尋時，發現同源性很高ICE (Interleukin-1 B converting enzyme)基因，而且在功能上也具有一致性，以轉基因技術將ICE基因轉移到大鼠細胞中，ICE基因的表達可以導致大鼠細胞的死亡。之後，ced-3 homologues 不斷被發現，而有不同的命名，如 caspase-1 (ICE), caspase-2 (ICH-1)。

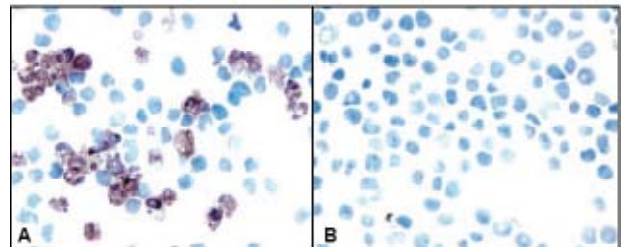
許多信號誘導細胞程序死亡時，蛋白水解酶- Caspase的活化，是引發細胞凋亡的共同的特徵。活化的Caspase會進行一連串的蛋白質酶解作用(proteolysis cascade)，將

死亡訊息送至更下游的物質，引發凋亡細胞的特徵性型態改變。活化的Caspase是主要的功能蛋白，Procaspase (30-55KD)是caspase的前身，是尚未活化的狀態，當凋亡啟動時，Procaspase會被自身裂解或是被其他活化的Caspase切割成為兩個次單位 (17-37KD和 10-12KD)，兩個次單位組成二聚體，即為活化的Caspase。

Caspase-3

在凋亡早期，活化的Caspase-3是主要的功能蛋白。凋亡細胞內，活化的Caspase-3進一步水解活化其他Caspase及胞漿內目標 (如D4-GDI)和核內目標 (如PARP)。為早期Apoptosis重量級指標Marker。

Immunohistochemistry

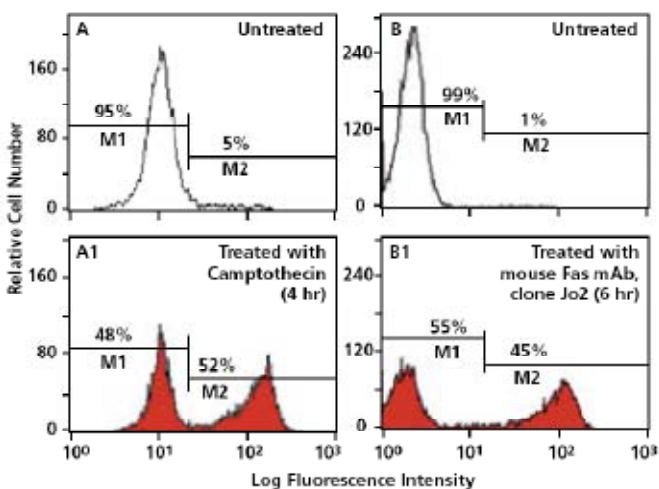


以IHC的方式在 Human Jurkat T cells 上觀察活化態 Caspase-3

(A)以6 μ M camptothecin 處理 Jurket cell 4小時後，經Cytospin以及acetone固定後，再染caspase-3，觀察其變化。(B) 對照組：沒有經過camptothecin處理

Description	Size	Cat. No.
Caspase-3, Active Form (CPP32)-Biotin	0.1 mg	557038
Streptavidin-Horseradish Peroxidase pre-diluted	500 tests	550946

Caspase-3



Flow cytometry

用流式細胞儀分析配合Caspase-3抗體分析凋亡與非凋亡細胞

(A, A1) Jurkat T cell (B, B1) mouse thymocyte, (A, B) 沒有經過處理 (A1) 經Camptothecin 處理4小時 (B1) 經 mouse Fas 抗體處理 (Cat. No. 554254)誘發凋亡產生。細胞經固定打洞後，再染上帶有特定螢光 Caspase-3 抗體。由上圖可見，經刺激過的細胞，約有50%左右細胞走向凋亡，可以偵測到活化態 Caspase-3。

Description	Size	Cat. No.
Caspase-3, Active Form, mAb Apoptosis kit-FITC	100 tests	550480
Caspase-3, Active Form, mAb Apoptosis kit-PE	100 tests	550914
Caspase-3, Active Form, pAb Apoptosis kit-PE	100 tests	559762

騰達行 客服專線
0800-211-819

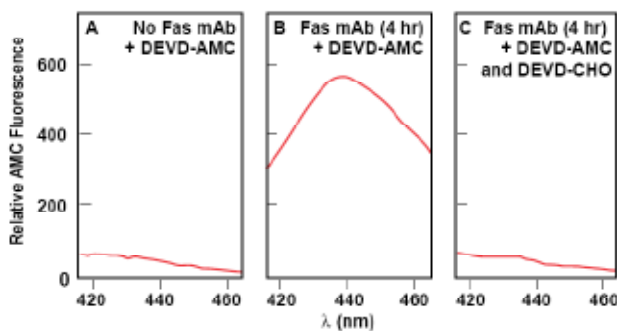
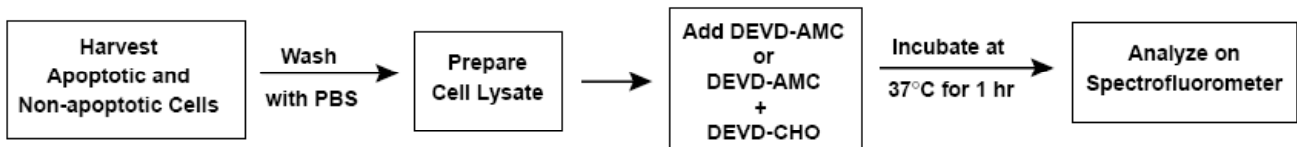
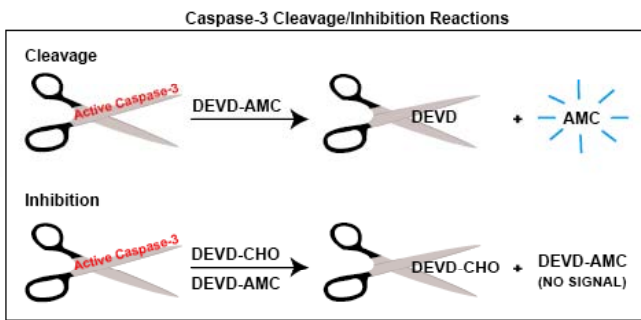
Contents: Fluorochromes -conjugated t Anti-Active Caspase-3 Antibody, BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution, and BD Perm/Wash™ Buffer

Caspase-3

Spectrofluorescence

96 well Foramt, 快速、靈敏、操作簡單

活化的Caspase為蛋白水解酶，針對其下游蛋白質有特定分解位置，利用此一特性合成tetra-peptide序列，模擬活化caspase切點，以Caspase-3為例，substrate Ac-DEVD-AMC會切在D(aspartate) 和 AMC之間，AMC被釋放出來後才會發出螢光。藉由偵測螢光含量，可以得知活化態Caspase-3的含量，搭配特定的Inhibitor，如Ac-DEVD-CHO，會抑制Caspase-mediated activity，可反證各類不同Caspase的專一性。BD Pharmingen提供一系列以螢光偵測Caspase活性的套組，Caspase 3, Caspase-6, Caspase 8和Caspase-9，對研究凋亡基轉相當有幫助喔。



以 Spectrofluorometric 分析 Caspase-3 活性

來自Daudi B 細胞Lysate，(A)是沒有處理過的，(B, C)是經抗FAS 抗體和Protein G處理4小時，(A)和(B)有加入Ac-DEVD-AMC, caspase-3 substrate，(C)則加入Ac-DEVD-CHO inhibitor。以spectrofluorometry分析結果，(B)經FAS處理產生凋亡可見Caspase-3的活化，(C)則因為加入抑制劑，Caspase-3與沒有經過FAS刺激的表現量(A)相同。

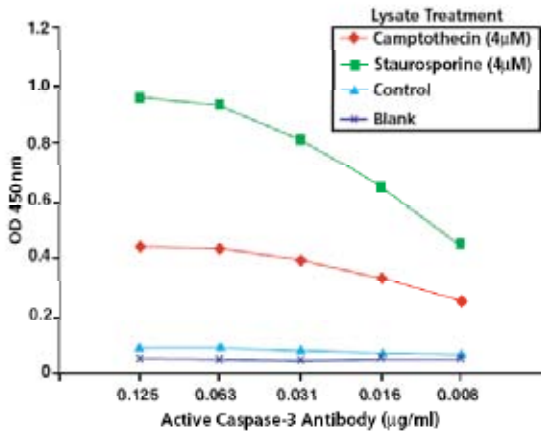
Description	Size	Cat. NO
Caspase-3 Assay Kit	100 tests	556485

Contents: PBS Buffer, Cell Lysis Buffer, HEPES Buffer, Caspase-3 Fluorogenic Substrate, Caspase-3 Inhibitor

Substrate and Inhibitor 專區

Description	Foramt	Size	Cat. No.
Caspase inhibitor negative control, Z-FA-FMK	Purified	1.0 mg	550411
General Caspase Inhibitor, Z-VAD-FMK	Purified	1.0 mg	550377
Caspase 3 Fluorogenic substrate, Ac-DEVD-AFC	Purified	1.0 mg	556574
Caspase 3 Fluorogenic substrate, Ac-DEVD-AMC	Purified	1.0 mg	556449
Caspase 3 Inhibitor, Ac-DEVD-CHO	Purified	1.0 mg	556465
Caspase 3 Inhibitor, Z-DEVD-FMK	Purified	1.0 mg	550378
Caspase 6 Inhibitor, Ac-VEID-CHO	Purified	1.0 mg	556550
Caspase 6 Inhibitor, Z-VEID-FMK	Purified	1.0 mg	550379
Caspase 8 Fluorogenic substrate, Ac-IETD-CHO	Purified	1.0 mg	556552
Caspase 8 Inhibitor, Ac-IETD-CHO	Purified	1.0 mg	556554
Caspase 8 Inhibitor, Z-IETD-FMK	Purified	1.0 mg	550380
Caspase 9 Inhibitor, Z-LEHD-FMK	Purified	1.0 mg	550381

BD Caspase-3 Active form



Description	Size	Cat. NO
Human Caspase-3 Active form ELISA set	Reagents for 5 plates	550930

ELISA

想要高通量篩檢是否發生細胞凋亡現象嗎?

Active caspase-3 expression in camptothecin- and staurosporine-treated Jurkat cells

Jurkat Cell 分別處理兩種不同的藥劑18小時，結果發現Active Caspase-3可以表現在Camptothecin或Staurosporine處理過的細胞發現，且經Staurosporine處理過的檢體，表現Active Caspase-3為Camptothecin的2.5倍。Control為不經處理的檢體。Capture Antibody 濃度為1.0ug/ml，Detection Antibody經過序列稀釋至0.008ug/ml。

Contents:

Capture Antibody : Purified anti-human active caspase-3,

Detection Antibod : Biotin anti-human active caspase-3

Enzyme Reagent : (SAV-HRP)

Standards : Human active caspase-3, lyophilized (5 vials)

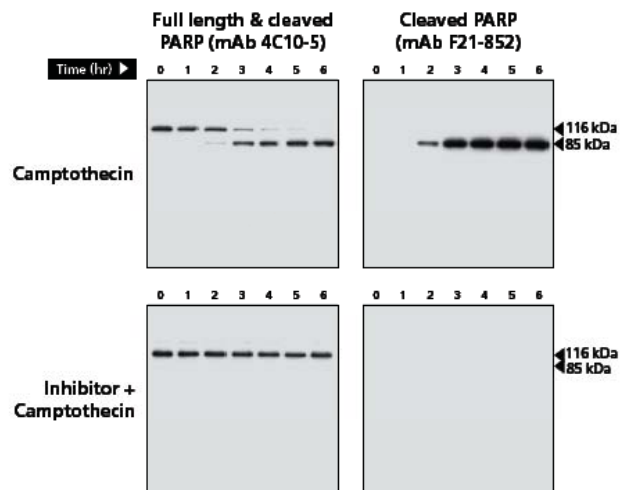
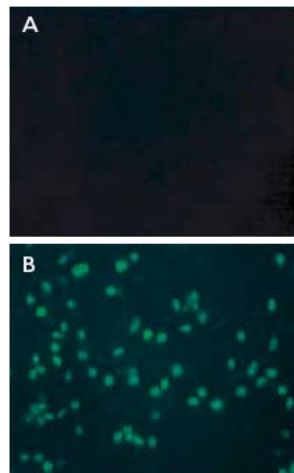
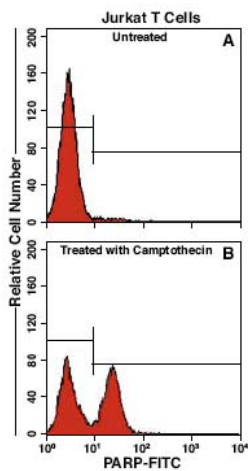
Analysis of Caspase Cleavage Products

Flow

IF

WB

Caspase的活化會造成下游目標蛋白被切割，最後導致細胞結構或是功能的改變，最後死亡，舉例來說，核內酵素PARP原本分子量為116kDa，被切割成為85kDa和24kDa的大小，BD提供各式經Caspase-3切割目標蛋白抗體，不論您是做Flow，IF，或是WB都可找到適合的產品喔。



Antibodies to Caspase-3 Protein Substrates

DESCRIPTION	REACT	CLONE	ISOTYPE	APPS	FORMAT	SIZE	CAT. NO
D4-GDI	Hu	Polyclonal	Rab	WB	Serum	100 µl	556498
D4-GDI (Cleavage-Specific)	Hu, Ms	97A1015	MslgG ₁	WB	Purified	50 µg	550746
DNA-PK (p350)	Mam	4F10C5	MslgG ₁	IP, WB	Purified	100 µg	556456
Fractin (Cleaved Actin)	Hu	Polyclonal	Rab Ig	IHC, WB	Purified	100 µl	551527
PARP	Dog, Hu, Ms, Rat	42	Ms IgG ₁	IF, WB	Purified	50/150 µg	611038/39
	Hu	4C10-5	MslgG ₁	Blot, FCM, IP, WB	Purified	100 µg	556494
	Hu	7D3-6	MslgG ₁	WB	Purified	50/150 µg	551024/25
	Bov, Ham, Hu, Ms	C2-10	MslgG ₁	IF, WB	Ascites	100 µl	556362
PARP, Cleavage Site-Specific	Bov, Hu	Polyclonal	Rab Ig	WB	Serum	200 µl	551923
PARP, Cleaved Form (Asp214)	Hu, Ms	F21-852	MslgG ₁	WB	Purified	50/150 µg	552596/97
PRK2 (PKN2, PAK-2)	Hu	22	Ms IgG ₁	IF, WB	Purified	50/150 µg	610794/95
Rb (a.a. 332-344)	Hu, Mink, Monk, Ms, Qua, Rat	G3-245	MslgG ₁	FCM, GS, IF, IHC(F), IHC(Fr)IP, WB	Purified	100 µg	554136
RhoGDI/D4-GDI	Hu	Polyclonal	Rab	IP, WB	Serum	100 µl	556511
SREBP-1	Ham, Hu	IgG-2A4	MslgG ₁	IP, WB	Purified	100 µg	557036
SREBP-2	Hu	IgG-1C6	MslgG ₁	IP, WB	Purified	100 µg	557037