

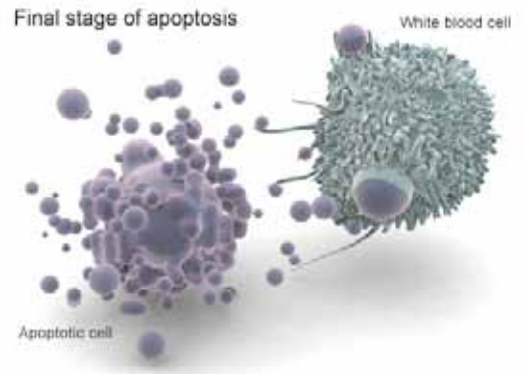


# Apoptosis 細胞凋亡

細胞偵察隊 ~ 帶您——破解 apoptosis 謎團

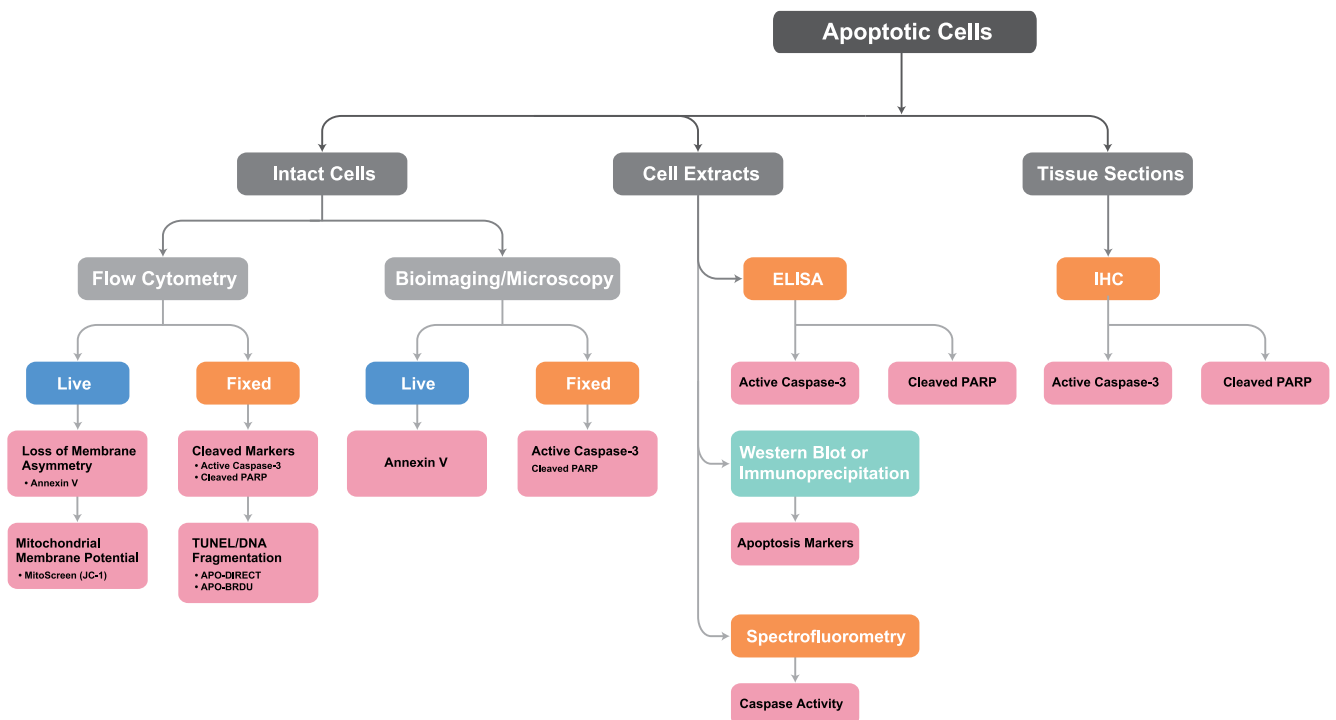
## Apoptosis 小百科

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。近來研究發現，apoptosis (細胞凋亡) 是細胞自發性的自殺行為，起因可能來自於外界環境、生長發育、細胞恆定等等因素。凋亡細胞外觀上的變化包括：會喪失微絨毛、偽足等胞膜結構，細胞變圓等；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，不發生包器及胞膜的破裂，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。



線索  
1

## By 實驗 materials & assays



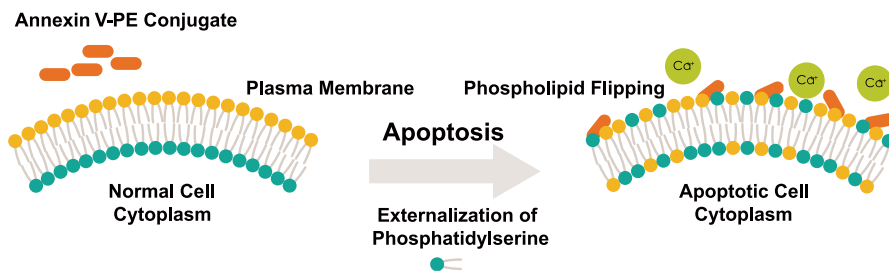


線索  
2

# By apoptosis 四大指標

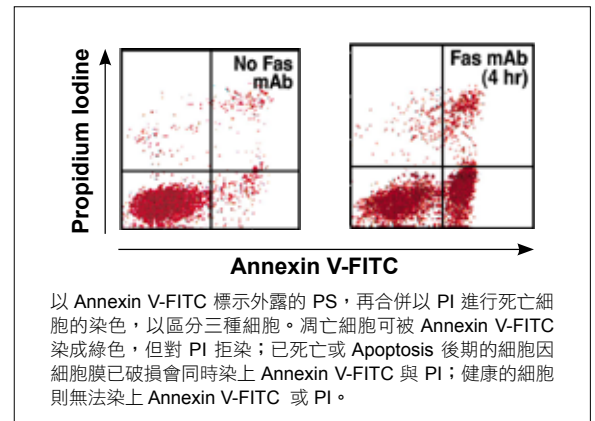
Feature Measured	Assays	Key Features
細胞膜 PS 外翻	Annexin V binding assay • Single conjugates antibody - PE or FITC • Annexin V kits"	• 偵測早期 apoptosis marker • 快速又簡單 • 可應用於 Flow cytometry 或 immunofluorescence
粒線體膜電位改變	• BD MitoScreen Kit	• 快速又簡單 • 利用 Flow cytometry 偵測單一顆細胞的變化
Caspase 活化	• Caspase Activity Assay Kits and Reagents • Active Caspase-3 immunoassays	• 可應用於 ELISA, flow cytometry, 或 Western blot
DNA 片段化	• APO-BrdU TUNEL Assay • APO-DIRECT TUNEL Assay	• 適用 adherent cells & suspension cells • 可搭配 cell cycle analysis 一併利用 Flow cytometry 分析結果

## Step 1 破解細胞膜 PS 外翻



凋亡細胞在早期 Phosphatidyl-serine ( PS) 會由細胞膜內外翻至膜外，利用 Annexin V 偵測能讓您作為最快速方便的 apoptosis 指標。

- 只需 **15 分鐘**，讓您快速偵測早期 **apoptosis** 指標。
- 無須固定，活細胞即可偵測。
- 可利用 **Flow cytometry** 或 **immunofluorescence** 分析結果。
- 選擇性多，可搭配 **Kit** 或是抗體。



### 訂購資訊

Kit				
貨號	品名	內容物	應用	容量
556547	Annexin V : FITC Apoptosis Detection Kit I	Annexin V-FITC, Propidium Iodide Staining Solution, Annexin V Binding Buffer	Flow Cytometry	100 tests
556570	Annexin V : FITC Apoptosis Detection Kit II	Purified Recombinant Annexin V, Annexin V-FITC, Propidium Iodide Staining Solution, Annexin V Binding Buffer	Intracellular Staining (Flow)	100 tests
559763	Annexin V : PE Apoptosis Detection Kit I	Annexin V-PE, 7-AAD, Annexin V Binding Buffer	Intracellular Staining (Flow)	100 tests
550911	Annexin V : FITC Fluorescence Microscopy Kit	Annexin V-FITC, Annexin V Binding Buffer, PBS Buffer	Immunofluorescence	25 Slides

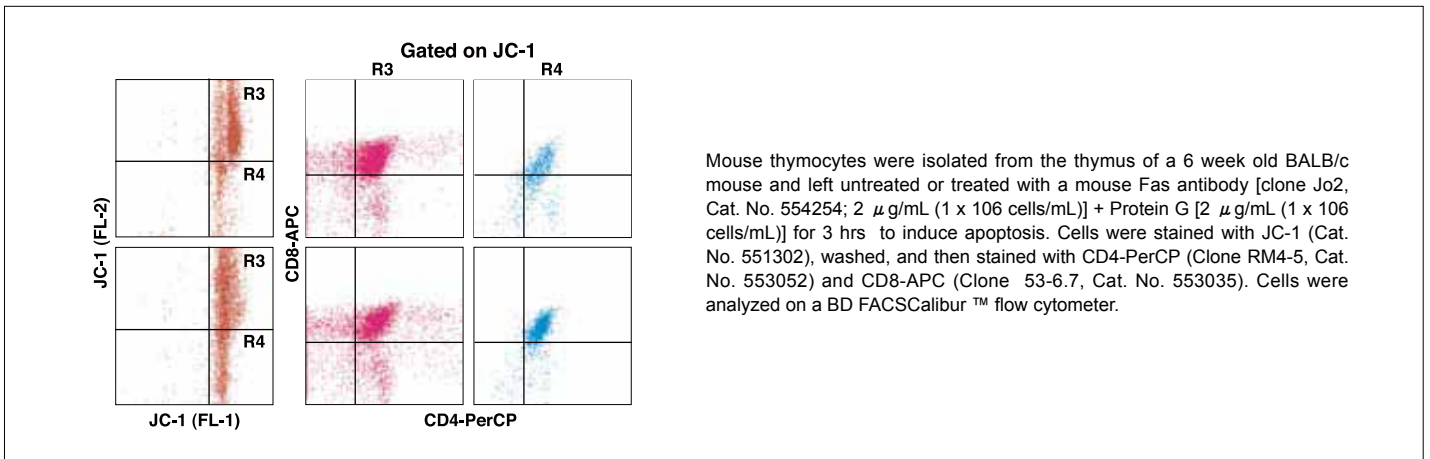
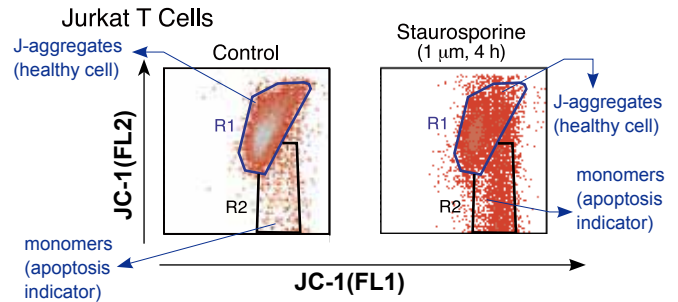
抗體					
貨號	品名	容量	貨號	品名	容量
560931	Annexin V-FITC	25 tests	560506	Annexin V-V450	50 tests
556420	Annexin V-FITC	100 tests	559933	Annexin V-Cy5	100 tests
556419	Annexin V-FITC	200 tests	559934	Annexin V-Cy5	200 tests
560930	Annexin V-PE	25 tests	559935	Annexin V-Cy5.5	100 tests
556422	Annexin V-PE	100 tests	556418	Annexin V-Biotin	100 tests
556421	Annexin V-PE	200 tests	556417	Annexin V-Biotin	200 tests
561012	Annexin V-APC	25 tests	556416	Annexin V-Purified	0.1 mg
550474	Annexin V-APC	100 tests	556454	Annexin V Binding Buffer, 10X Concentrate	50 ml
550475	Annexin V-APC	200 tests	556463	Propidium Iodide Staining Solution	2 ml

## Step 2 破解粒線體膜電位改變

當細胞凋亡時粒線體膜電位的改變，導致粒線體膜的通透性改變，使 Cytochrome C 釋放至細胞質中，引發下游酵素反應活化，使 Caspase 活化，造成一連串凋亡反應。

利用 BD 粒線體特異性染料 JC-1 幫助您快速偵測粒線體膜電位改變的程度。JC-1 有兩種形式，正常生理狀態下，粒線體負電性高，JC-1 進入粒線體以多聚體 (Aggregates) 存在，FL2 可觀察到多數紅色螢光，當細胞走向凋亡時，粒線體去極化產生，負電性降低，JC-1 則以單體 (Monomer) 存在於細胞質，在 FL1 可以觀察到綠色螢光的增加。

- 只需 15 分鐘，JC-1 輕鬆快速染出粒線體膜電位的改變。
- 無須固定，活細胞即可偵測。
- 利用 Flow cytometry 分析結果。
- 方便，kit 內包含實驗所需的試劑。
- 操作簡單，kit 附有詳細完整的 protocol。



### 訂購資訊

貨號	品名	應用	容量
551302	BD™ MitoScreen (JC-1)	Intracellular Staining (Flow)	100 tests

## Step 3 破解 Caspase 活化

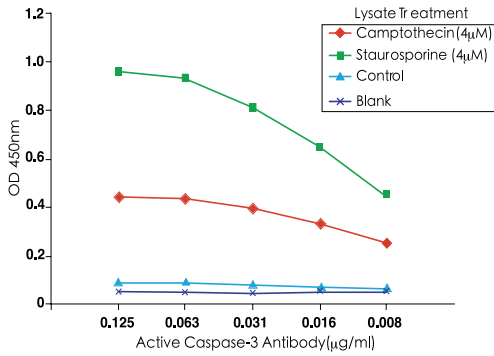
### Activation of Caspase -3

許多信號誘導細胞程式死亡時，Caspase 的活化，是引發細胞凋亡的共同的特徵。活化的 Caspase 會進行一連串蛋白質降解作用 (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 或 Bcl-2) 和核內目標 (如 PARP)。為早期 Apoptosis 重量級指標。

## ELISA



- high-throughput screening。
- 高專一性、高靈敏性。

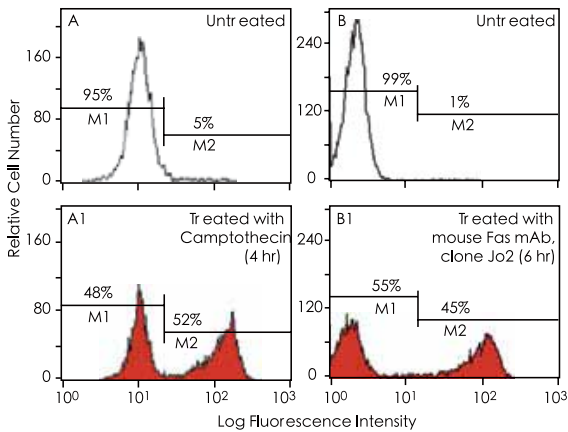
### Active caspase-3 expression in camptothecin- and staurosporine-treated Jurkat cells

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 經過稀釋至 0.008ug/ml。

訂購資訊

貨號	品名	react	應用	容量
550578	Caspase-3, Active Form, ELISA Pair	human	ELISA	Reagents for 10 plates

## Flow cytometry



### 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。

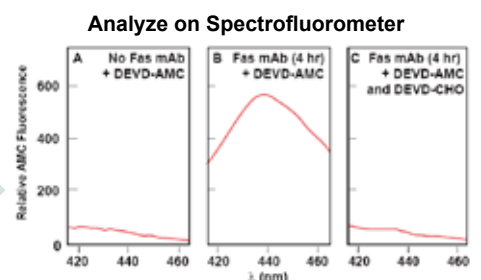
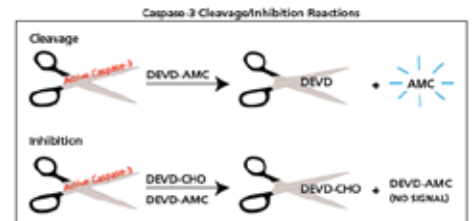
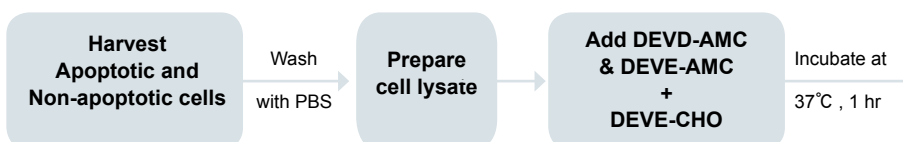
訂購資訊

貨號	品名	內容物	應用	容量
550480	Caspase-3, Active Form, mAb Apoptosis Kit : FITC	FITC-conjugated Monoclonal Rabbit Anti-Active Caspase-3 Antibody BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution BD Perm/Wash™ Buffer	Flow Cytometry	100 tests
550917	Caspase-3, Active Form, mAb Apoptosis Kit : PE	PE-conjugated Monoclonal Rabbit Anti-Active Caspase-3 Antibody BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution BD Perm/Wash™ Buffer	Flow Cytometry	100 tests

## Spectrofluorescence

- 利用 Spectrofluorometric assay 分析結果。
- 偵測多種 Caspases 活性。
- 快速、靈敏、操作簡單。
- 96 well plate 型式。

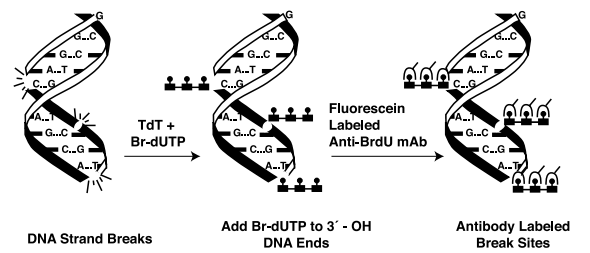
原理：活化的 Caspase-3 為蛋白水解酶，能夠特異切割受質 Ac-DEVD-AMC 上，會切在 D ( aspartate ) 和 AMC 之間，使 AMC 被釋放出來後才會發出螢光。再搭配 caspase-3 抑制劑 Ac-DEVD-CHO，藉由專一性抑制 caspase-3 activity，進而偵測螢光含量，可以得知活化態 Caspase-3 的表現量。



Caspase Substrates and Inhibitor Peptides		
貨號	品名	容量
556485	Caspase-3 Assay Kit	100 tests
內含物：PBS Buffer, Cell Lysis Buffer, HEPES Buffer, Caspase-3 Fluorogenic Substrate, Caspase-3 Inhibitor		
Caspase Substrates and Inhibitor Peptides		
貨號	品名	容量
556574	Caspase-3 Fluorogenic Substrate, Ac-DEVD-AFC	1.0 mg
556449	Caspase-3 Fluorogenic Substrate, Ac-DEVD-AMC	1.0 mg
556465	Caspase-3 Inhibitor, Ac-DEVD-CHO	1.0 mg
550378	Caspase-3 Inhibitor, Z-DEVD-FMK	1.0 mg
556552	Caspase-8 Fluorogenic Substrate, Ac-IETD-AFC	1.0 mg
556554	Caspase-8 Inhibitor, Ac-IETD-CHO	1.0 mg
550380	Caspase-8 Inhibitor, Z-IETD-FMK	1.0 mg
550381	Caspase-9 Inhibitor, Z-LEHD-FMK	1.0 mg
550377	General Caspase Inhibitor, Z-VAD-FMK	1.0 mg
550411	Caspase Inhibitors Negative Control, Z-FA-FMK	1.0 mg
552892	BD™ ApoBlock Caspase Inhibitor	1.0 mg
Recombinant Proteins		
貨號	品名	容量
556472/ 556471	Caspase-3, Active Form, Recombinant Human Protein	5 µg/ 10 µg
556481/ 556480	Caspase-8, Active Form, Recombinant Human Protein	5 µg/ 10 µg

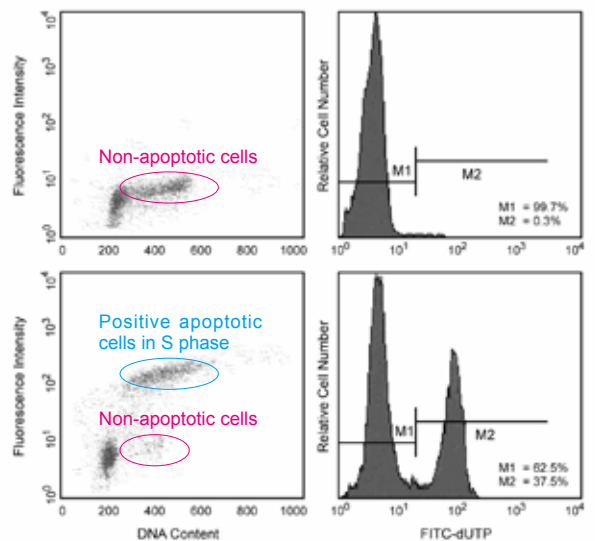
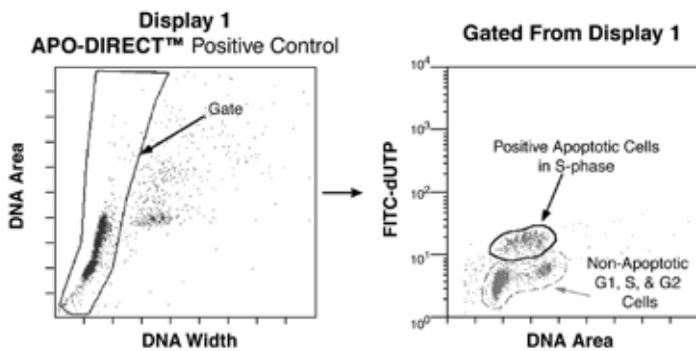
## Step 4 破解 DNA Fragmentation ( TUNEL detection )

細胞凋亡時，在 apoptosis 後期會發生細胞核內 DNA 斷裂而片斷化的現象。當 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的甘核酸，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 )。



- 適用 adherent cells & suspension cells 。
- 可搭配 cell cycle analysis 一併利用 Flow cytometry 分析結果。

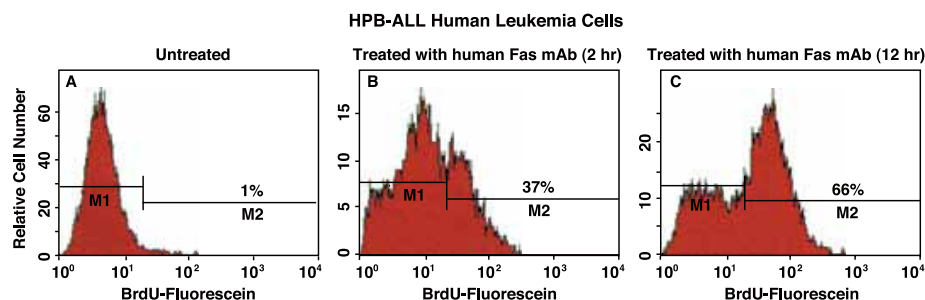
## APO-DIRECT Assay



### Flow Cytometry Data of APO-DIRECT™

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。如上圖所示，凋亡細胞主要在 S 期

## APO-BrdU Assay



**Flow cytometric analysis of HPB-ALL human leukemia cells using an APO-BrdU assay.**

HPB-ALL human leukemia cells 處理 Fas mAb, clone DX2 ( Cat. No. 555670 ) 和 Protein G 2 小時 ( B ) 和 12 小時 ( C ) 後細胞經固定再加入 Br-dUTP 和 TdT enzyme 一起作用後，利用 fluorescein labeled anti-BrdU mAb 偵測 Br-dUTP 表現量。結果發現 apoptotic cells 之 Br-dUTP 的表現量有明顯增加的情形發生。

### 訂購資訊

貨號	品名	內容物	應用	容量
556381	Apoptosis Detection Kit (APO-Direct)	FITC-dUTP PI/RNase Staining Buffer Reaction Buffer Rinsing Buffer Wash Buffer TdT Enzyme Negative Control Cells Positive Control Cells	Flow Cytometry	50 tests
556405	Apoptosis Detection Kit (APO-BRDU)	FITC-Labeled Anti-BrdU mAb PI/RNase Staining Buffer Reaction Buffer Rinsing Buffer Wash Buffer Br-dUTP TdT Enzyme Negative Control Cells Positive Control Cells	Flow Cytometry	60 tests

買就送  
滿額再送

**BD Pharmingen × Neptune  
= 100% Match**

使用最佳的試劑做實驗，當然要搭配最優工具！

凡購買本季刊上所列任何 **BD Pharmingen** 商品就送雙重好禮

1. 每買一項商品就贈送 **Neptune 1000ul Barrier Tip ( 貨號：BT1000-1 )** 壹盒。
2. 單筆訂單滿 **5000**，再送 **Neptune 1.6ml Microcentrifuge Tube ( 貨號：3745 )** 壹包。