

使用 Annexin V-FITC 和 4μl 7-AAD 检查细胞凋亡

简介

细胞毒性实验用于评估细胞培养的健康状况，评估化合物的毒性，在许多实验室有广泛的开展。用于评估细胞毒性的仪器需要可靠、易于使用和相对快速的特点。

Countstar® FL（图 1）是一个智能的、直观的细胞分析仪器用于多种细胞实验，包括转染，细胞凋亡，细胞表面标志物，细胞活力，抗体亲和力和细胞周期的评估。该系统提供了强大的荧光定量结果。易于使用的自动化程序指导你完成细胞图像采集到数据分析的过程。



图 1 . Countstar® FL 系统结合数字显微镜和图像分析功能的台面设备

材料:

Countstar® 产品

Countstar® FL 细胞分析仪

Countstar® 样品板

Countstar® 细胞凋亡检测试剂盒 (CS02002-50)

0.2% 台盼蓝染色液 (CS0101001-50)

其他材料

CHO-K1 细胞 (ATCC)

嘌呤霉素 (Gene operation)

DMEM 细胞培养基 (Hyclone-SH30243.01)

胎牛血清 (Hyclone-SH30084.03)

胰酶 (Hyclone-SH30042.01)

软件

DeNovo® FCS Express 5 Image

GraphPad Prism5®

方法:

细胞培养基

CHO-K1 细胞培养在完全培养基中, 组成为: 500ml DMEM 培养基, 2 mM L-谷氨酰胺, 1.5 g/L 碳酸氢钠和 10% 胎牛血清。

药物处理

1. 将 CHO-K1 细胞接种在 6 孔板中, 密度为 200,000 细胞/孔, 随后将细胞培养板孵育在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中 24 小时。
2. 24 小时后去除旧培养基并加入含有不同浓度诺考达唑的新鲜细胞培养液。继续孵育培养板在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中 48 小时。
3. 消化收集细胞

染色步骤:

- 1) 制备 300,000-500,000 个细胞/样品用于细胞凋亡分析;
- 2) 将每个样品 400 g 离心 5 分钟, 吸去上清并用 200 µl PBS 重悬;
- 3) 400 g 离心 5 分钟, 吸去上清并用 100 µl 的 Annexin V 结合液重悬;
- 4) 每个样品中加入 1.5µl Annexin V-FITC 和 4µl 7-AAD, 轻轻混匀;
- 5) 避光孵育 10 分钟;
- 6) 400 g 离心 5 分钟, 吸去上清并用 200 µl PBS 重悬, 清洗 1 遍;

7) 吸去上清，用 100 μ l Annexin V 结合重悬；

图像获取及数据分析

1. 双荧光模块的程序用于获取 FITC 及 7-AAD 通道的图像。
2. 每个样品检测 3 个视野，每个样品重复检测 2 次。
3. 图像获取完成后，导出数据用 FCS 软件进行分析。

嘌呤霉素梯度稀释添加剂量

典型抗生素对哺乳动物细胞作用浓度是 0.5-10 μ g/ml 嘌呤霉素。嘌呤霉素对细胞作用的梯度剂量（0 μ g/ml -45 μ g/ml）如下图所示（图 2）。

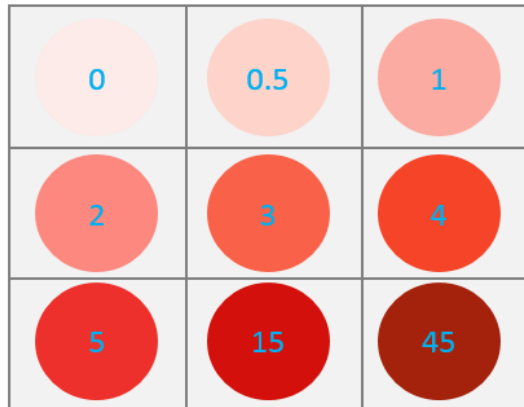


图 2. 每个单孔中添加的嘌呤霉素如上所示 (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 15, 45 μ g/ml) 。

Countstar[®] FL FL 系统进行图像获取

Countstar FL 内置的细胞凋亡检测程序进行明场，FITC, 7-AAD 图像的获取。明场的图像作为一个参考标准对荧光场的图像进行分割，进而获取荧光场的信号。0 μ g/ml 和 45 μ g/ml 的处理样本图像结果如图 3 所示。

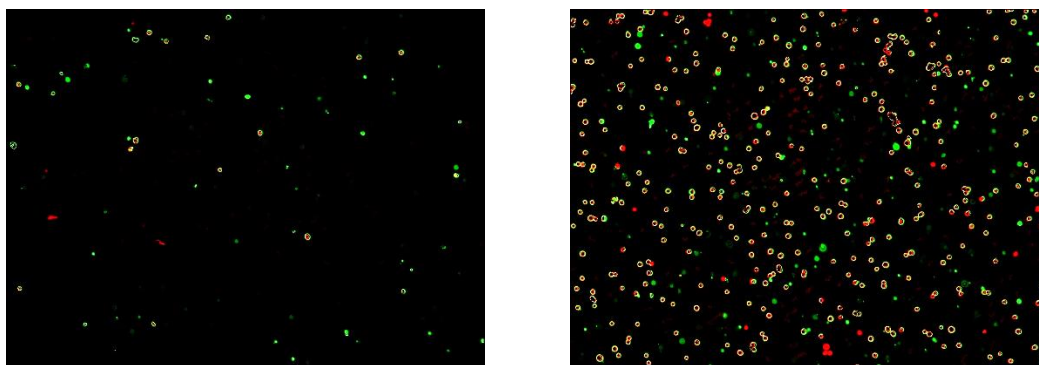
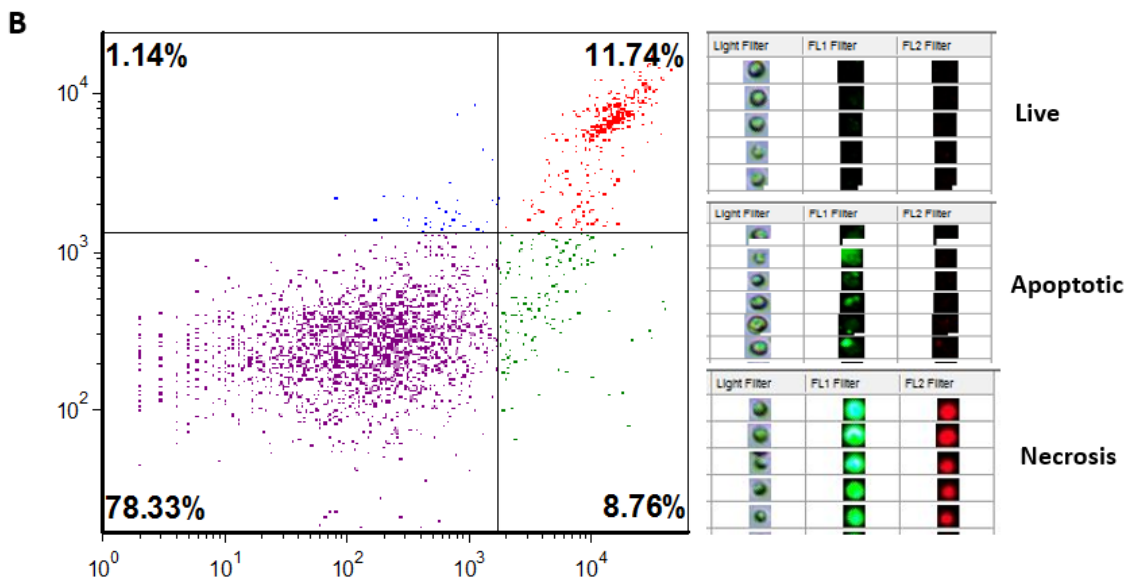
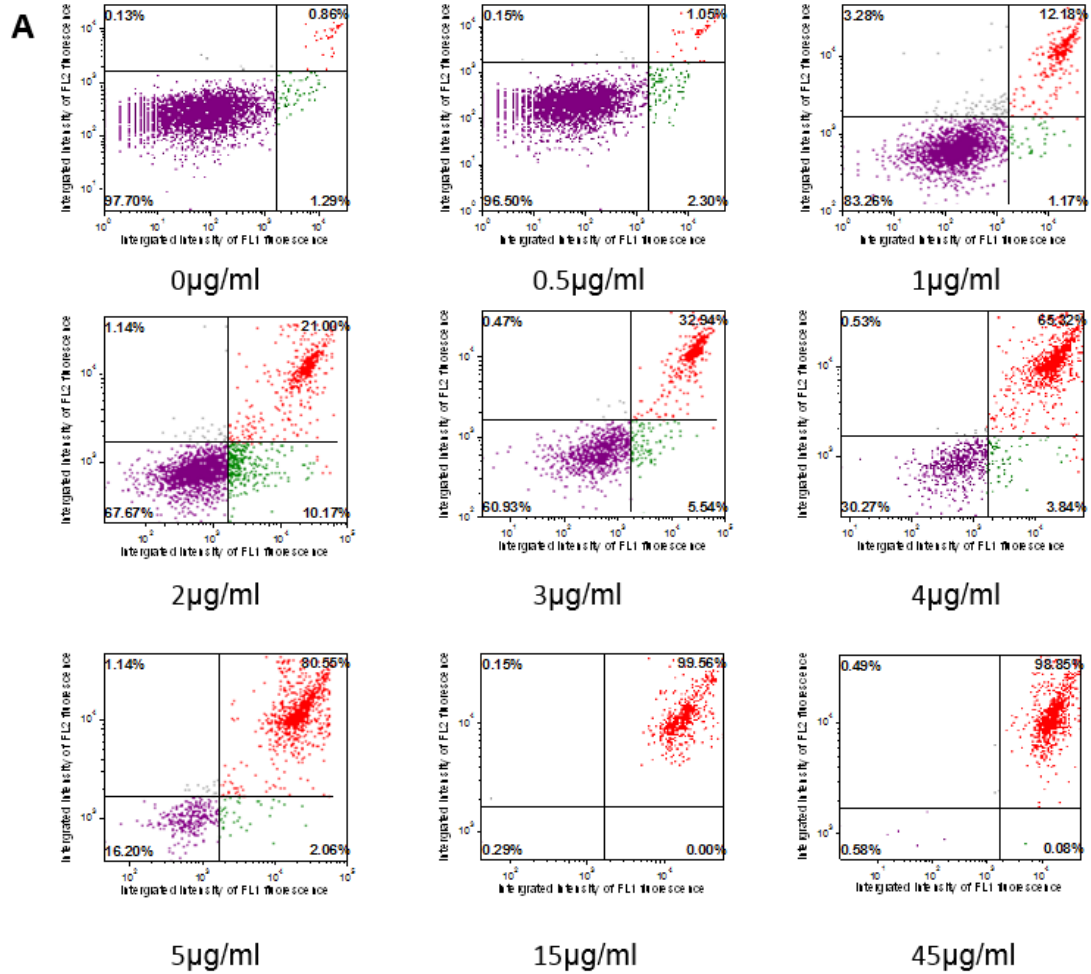


图 3. 0 μ g/ml 和 45 μ g/ml 处理的细胞样本图像结果。 左边. 0 μ g/ml 样本, 有少量的荧光信号。 右边. 45 μ g/ml 样本, 大部分细胞被 FITC 和 7-AAD 同时染色。

嘌呤霉素对 CHO-K1 细胞的杀伤曲线

用 FCS5 软件对结果进行分析, 根据荧光强度对细胞群体进行设门 (图 4A), FCS 软件同时提供了单个细胞浏览功能 (图 4B), 用 Graphpad Prism5 对嘌呤霉素的 IC50 进行分析。



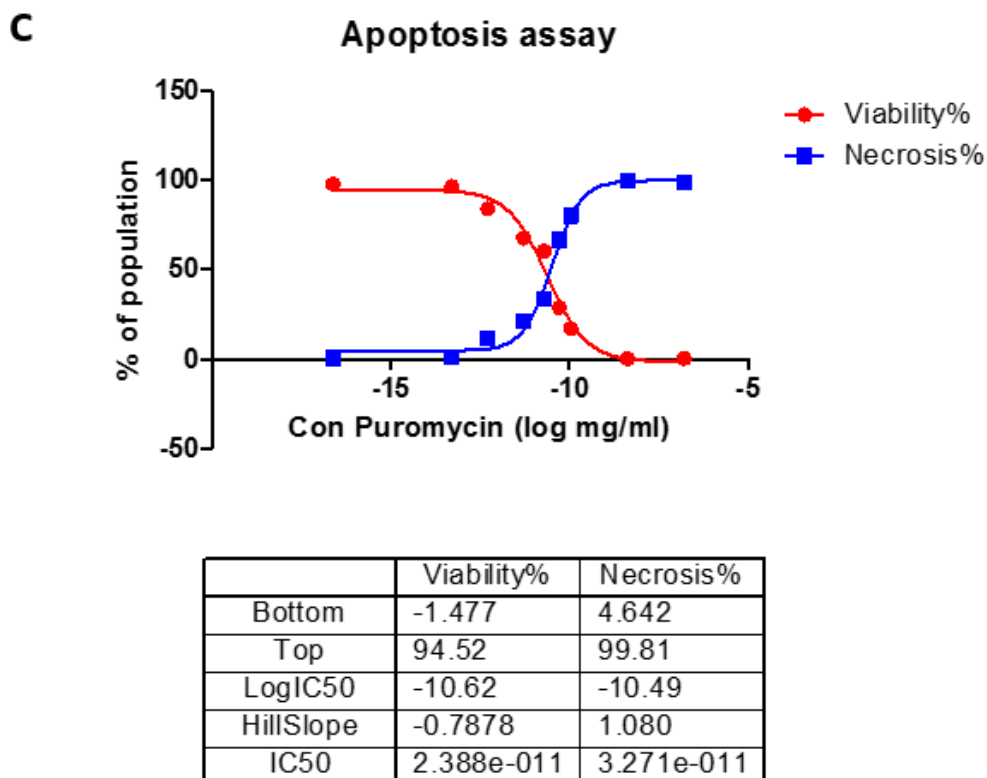
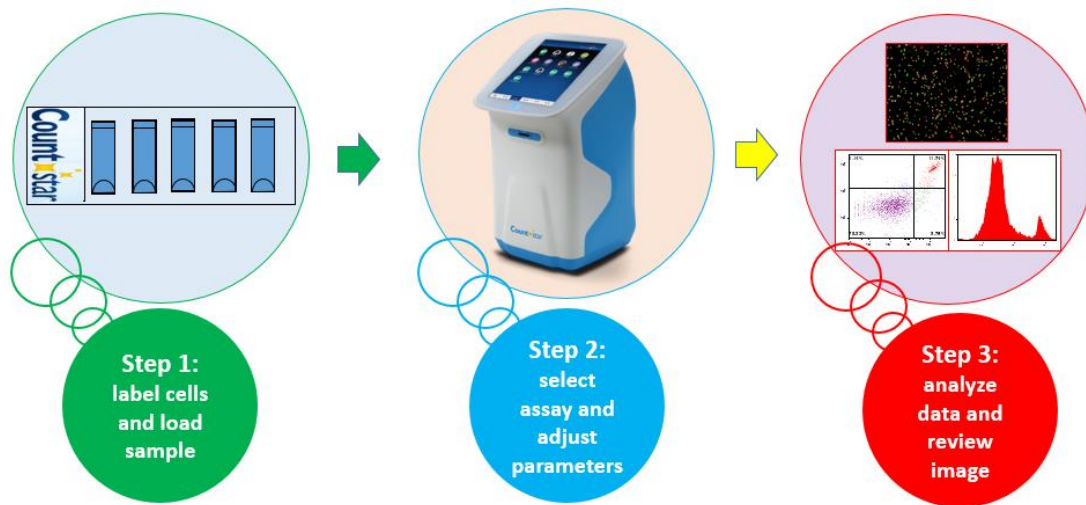


图 4. **A.** 用 FCS5 软件对活细胞，早期凋亡细胞，晚期凋亡细胞进行设门分析，随着药物浓度增加，晚期凋亡的细胞逐渐增加。**B.** FCS5 软件可以对每一个象限中的单个细胞进行浏览分析 **C.** Graphpad Prism5 分析嘌呤霉素的 IC50 结果。

总结：

Countstar® FL 系统提供了一个快速和容易的方法评价细胞毒性。FCS Express 软件提供了查看每一个细胞的功能，通过图像验证数据。此外，它是融合了电子显微镜，图像处理，自动细胞计数于一体的设备。预置多个实验模块，比如细胞周期，细胞凋亡，抗体亲和力，细胞转染，细胞计数，简化了实验室细胞分析任务，同时提供高质量的科学数据。此外，在大规模或者高通量筛选实验之前，Countstar® FL 可以提供一个快速的实验结果。



网址: <http://www.countstar.cn>

上海睿钰生物科技有限公司总部

电话: +86-021-33735070

传真: +86-021-52261001

邮件: marketing@countstar.cn

地址: 上海市松江区沈砖公路 6000 号创异工房 C3 栋 301 室, 201619

睿钰生物科技有限公司欧洲分部

电话: +49-160-97847082

传真: +49-5225-8714881

邮件: bodo.kohring@countstar.cn

地址: Bachstraße 16, 32139 Spenge, Germany

Countstar® FL 仅限用于科研!

Countstar
Easy Cell Analysis