

RealTime-GloTM Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay

产品使用说明

JA1011, JA1012, JA1000, JA1001





RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay

所有技术手册可浏览：www.promega.com/protocols/
访问网站以确认您正在使用本技术手册的最新版本。
如果你对使用这个系统存有疑问，请发送电子邮件至 Promega 技术服务部门：chinatechserv@promega.com

1. 产品描述	2
2. 产品组成和储存条件	4
3. 开始之前	6
3. A. 仪器和多孔板建议	6
3. B. 用户提供的材料	6
3. C. 2 × 检测试剂溶解度的考虑	6
3. D. 细胞对检测试剂的耐受性	7
3. E. 实时收集数据的建议	7
4. 操作步骤	8
4. A. 推荐的对照	8
4. B. 2 × 检测试剂的制备	9
4. C. 检测操作流程	10
4. D. 数据分析	12
4. E. 数据解释	12
4. F. 示例数据	13
5. 参考文献	15
6. 附录	16
6. A. 影响实时检测信号强度和持续性的因素	16
6. B. 限制性体积的备选操作步骤	17
6. C. 与其他检测联合使用	18
6. D. 相关产品	24

1. 产品描述

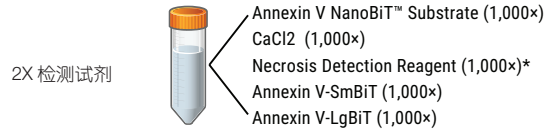
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (RealTime-Glo™ Annexin V 凋亡和坏死检测试剂盒) (a-d) 实时监测凋亡进程中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻 (图 1), 检测 PS 外翻是经证实可靠的凋亡评估方法 (1)。RealTime-Glo™ 检测方法, 应用简单的发光信号检测 annexin V 与 PS 的结合, 通过荧光信号检测坏死。信号应用多功能微孔板读数仪检测。

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay 试剂盒中检测试剂 (Detection Reagent) 含有近等摩尔比的两种 annexin V 融合蛋白 (Annexin V-LgBiT 和 Annexin V-SmBiT), 分别含有 NanoBiT® 萤光素酶的互补亚基。该试剂还提供了随时间缓释的萤光素酶底物, 以在实验暴露期间提供持续的底物来源。因为 Annexin V-LgBiT 和 Annexin V-SmBiT 萤光素酶亚基只有对于彼此微弱的亲和力, 发光信号维持在低水平, 直到 PS 外翻使两个亚基互补接近信号才会增加。Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Cat.# JA1011, JA1012) 中还包括一种不能渗透进活细胞的 DNA 荧光染料, 检测细胞坏死。检测试剂对广泛类型的细胞培养物具有良好的适用性, 可将检测试剂在给药时或处理前加入, 以实时测量剂量和时间依赖性的凋亡进程。



图 1. 实时生物发光检测凋亡细胞 PS 外翻进程。在 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 中, 在荧光信号增加 (由于膜完整性丧失) 之前, 发光信号时间依赖性增加反映了细胞凋亡过程。发光和荧光信号都增加则符合细胞凋亡之后或其他非凋亡机制后的继发性坏死。

在无菌管中使用适合的完全培养基稀释以下各组分
500 倍，以制备 2X 检测试剂



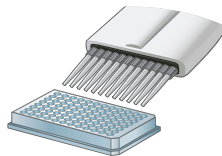
接种合适密度的细胞 (50 μl)



按照 4 × 预计的药物终浓度加药处理细胞 (50 μl)



加入等体积 2X 检测试剂 (100 μl)



孵育

检测 RLU 和 RFU (根据所需时间点重复检测)



GloMax® 系统

图 2. RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 96-孔板检测流程。

RLU = 相对发光单位 (Relative Luminescence Units) RFU = 相对荧光单位 (Relative Fluorescence Units)

* RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay (Cat.# JA1000, JA1001) 中不提供 Necrosis Detection Reagent (坏死检测试剂)。

2. 产品成分和储存条件

产品	规格	货号
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	100 assays	JA1011

含有足够的试剂，可以 96 孔板形式进行 100 次反应，或者在 384 孔板中进行 400 次反应。包括：

- 25µl Annexin V-LgBiT (1,000 ×)
- 25µl Annexin V-SmBiT (1,000 ×)
- 250µl CaCl₂(1,000 ×)
- 25µl Annexin V NanoBiT® Substrate (1,000 ×)
- 25µl Necrosis Detection Reagent (1,000 ×)

产品	规格	货号
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	1000 assays	JA1012

含有足够的试剂，可以 96 孔板形式进行 1000 次反应，或者在 384 孔板中进行 4000 次反应。包括：

- 250µl Annexin V-LgBiT (1,000 ×)
- 250µl Annexin V-SmBiT (1,000 ×)
- 250µl CaCl₂ (1,000 ×)
- 250µl Annexin V NanoBiT® Substrate (1,000 ×)
- 250µl Necrosis Detection Reagent (1,000 ×)

产品	规格	货号
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay	100 assays	JA1000

含有足够的试剂，可以 96 孔板形式进行 100 次反应，或者在 384 孔板中进行 400 次反应。包括：

- 25 µl Annexin V-LgBiT (1,000 ×)
- 25 µl Annexin V-SmBiT (1,000 ×)
- 250 µl CaCl₂ (1,000 ×)
- 25 µl Annexin V NanoBiT® Substrate (1,000 ×)

产品	规格	货号
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay	100 assays	JA1001

含有足够的试剂，可以 96 孔板形式进行 1000 次反应，或者在 384 孔板中进行 4000 次反应。包括：

- 250µl Annexin V-LgBiT (1,000 ×)
- 250µl Annexin V-SmBiT (1,000 ×)
- 250µl CaCl₂ (1,000 ×)
- 250µl Annexin V NanoBiT® Substrate (1,000 ×)

储存条件：将所有组分储存在 - 30 °C 至 10 °C。Annexin V NanoBiT® 底物和坏死检测试剂（Necrosis Detection Reagent）避光储存。

1,000 × 试剂盒组分的稳定性

室温融化 1,000 × Annexin V NanoBIT[®] Substrate。尽量减少反复冻融循环次数。1,000 × Annexin V-LgBIT 和 Annexin V-SmBIT 融合蛋白储存于 50% 甘油中，在制备 2 × Detection Reagent 之前应置于冰上。如果试剂盒组分将在以后用于制备 2 × Detection Reagent，最好一次融化试剂后，按照单次用量进行分装。将未使用的分装试剂储存于 -30°C 至 -10°C。Annexin V NanoBIT[®] 底物和坏死检测试剂 (Necrosis Detection Reagent) 需避免长时间光照。

制备好的 2 × Detection Reagent 的稳定性

我们推荐只准备即刻使用所需用量的 2 × Detection Reagent；然而 2 × Detection Reagent 可被储存于室温、4°C 或 37°C 长达 18 小时，而没有检测到试剂的功能损失。请勿储存制备好超过 18 小时的 2 × Detection Reagent。

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 产品形式

试剂盒包括含有或不含有坏死检测试剂 (Necrosis Detection Reagent) 的形式：

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay^(a-d) (Cat.# JA1011 和 JA1012) 包含一个不能透过细胞膜的 DNA 荧光染料作为坏死检测试剂。当膜完整性受损时，染料进入细胞并结合 DNA，产生荧光信号。两种检测方式（发光和荧光）可以揭示 PS 外翻的机制。

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay^(a-c) (Cat.# JA1000 和 JA1001) 不包含坏死检测试剂。尽管该试剂盒可以不加坏死探针检测，但无法揭示 PS 外翻的机制。因此，当使用 Cat.# JA1000 或 JA1001 时，我们建议联合使用不对称花青染料如 CellTox™ Green (Cat.# G8742) 或结构相关的分子，以完善试剂盒的功能和明确数据结果。请不要使用碘化丙啶 (propidium iodide)，ethidium homodimer 或 Hoeschst 系列染料，因为这些染料在微孔板荧光应用中效果欠佳，且已知它们对细胞具有毒性。

3. 开始之前

在实验开始之前，请通读本说明书完整操作步骤（第 3 和 4 部分），以熟悉组分和试剂盒操作流程。

3.A. 仪器和多孔板推荐

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Cat.# JA1011, JA1012) 是多重检测，需要能够检测发光和“绿色光谱”荧光的多功能微孔板读数仪。本检测中荧光信号最佳波长为在 $485 \pm 20\text{nm}$ 激发， $525 \pm 30\text{nm}$ 发射波长范围内收集信号。可以使用 GloMax® Discover (Cat.# GM3000) 中预置的程序检测或使用其他仪器生产商建议的设置。

所有实验需在无菌、白色、组织培养处理的 96 孔多孔板中进行（如 Costar® 3917 不透光白板或 Costar® 3903 底部透明白板）或 384 孔板（如 Corning® 3570），以最小化孔与孔之间荧光和发光信号的交叉干扰。通常，和底部透明孔壁不透光白色培养板相比，不透光白色培养板会产生更高的发光和荧光信号强度值和更少的孔间交叉干扰。但使用白色、底部透明的多孔板获得的结果也可接受。

3.B. 用户需要准备的材料

- 无菌、白色、组织培养处理的 96- 孔多孔板（如 Costar® 3917 不透光白板或 Costar® 3903 底部透明白板）或 384 孔板（如 Corning® 3570）。
- 多功能微孔板读数仪，可检测发光信号和绿色荧光信号（ $485\text{nmEx}/525\text{--}530\text{nmEm}$ ）。
- 用于连续稀释化合物的无菌多通道加样槽。
- 用于添加其他成分的无菌加样槽。
- 单通道或多通道移液器和适当的无菌枪头
- 无菌锥形离心管。
- 已知能在细胞系中诱导细胞凋亡的阳性对照化合物。
- 溶剂（例如 DMSO），用于未处理细胞对照。
- 微孔板震荡仪

3.C. 2 × Detection Reagent 溶解度的考虑

Annexin V NanoBit® 底物在绝大多数常用生长和维持培养基中是可溶的，但其溶解度在血清（如 10% v/v 胎牛血清（FBS）或 10% v/v 马血清）等补充剂存在下大大增加。我们推荐将 Annexin V NanoBit® 底物加入到预热的完全培养基（正常生长培养基 +10% FBS）以制备 2 × Detection Reagent，然后立即涡旋溶液，直至底物完全溶解。如果使用限定或无血清生长培养基是必要的，我们强烈推荐使用蛋白质补充剂（细胞因子、生长因子、白蛋白等）来维持底物溶解度。

Annexin V-PS 结合相互作用是 Ca^{2+} 依赖的。虽然大多数常用的生长和维持培养基的配方中含有足以支持 annexin V-PS 结合的 CaCl_2 水平，但添加 Ca^{2+} ，对 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Detection Assay 结果有益。在 FBS 存在下，预热培养基中，会让外加的 Ca^{2+} 的溶解度大大增强。

3.D. 细胞对检测试剂的耐受性

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 检测试剂与多种常规贴壁和悬浮细胞系共孵育培养，在长达 72 小时的时间内，未产生可检测的细胞毒性。在实时研究细胞凋亡过程中，优化了分析试剂组分的浓度以保持生物学惰性，并最大限度地提高发光强度和信号持久性。然而，使用者都应该考虑到在使用过程中特定细胞系可能对 annexin 检测试剂的敏感性⁽²⁻⁴⁾。为了确认细胞对试剂的耐受性，我们建议在预期处理细胞的期间内，在存在 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 试剂和只有坏死检测试剂（Necrosis Detection Reagent）的情况下，建立未处理组和处理组对照的比较。如果 annexin 试剂产生可测量的额外毒性，它只应最小限度地影响试验化合物凋亡诱导的动力学或影响细胞到继发性坏死的进程。Annexin 试剂产生的细胞毒性效应可以通过降低 Annexin V NanoBit® 底物的浓度来消除或最小化，然而，这将随着时间的推移降低整体发光强度和信号的持久性。

提示购买 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay (Cat.# JA1000, JA1001) 的用户可以选择添加自己的坏死检测试剂 (Necrosis Detection Reagent)： CellTox™ Green 试剂 (Cat.# G8741, G8742) 是经验证无毒的检测细胞坏死的探针，可以与 2 × Detection Reagent 联合使用，并不会对细胞产生毒性作用。细胞对其他荧光坏死检测探针的耐受性（和能否被活细胞排斥）仍存在一定疑问（未公布的内部数据），在加入检测试剂之前用户应对这些问题加以确认。

3.E. 采集实时数据的建议

发光和荧光数据的实时收集可以通过三种主要方法，所有这些方法都需要能够同时读取荧光和荧光的多功能检测仪器。

1. 应用含有温度和气体 (CO₂) 控制模块的多功能检测仪器进行动力学检测：细胞可在应选择的完全培养基中培养。如果读取时间不超过设定的时间间隔，则可以在设定的期间内，任何时间间隔重复地收集发光和荧光信号。在没有提供合适湿度的环境中，进行多天实验时，应考虑“边缘效应”和 / 或板盖内表面的过度冷凝。

应用只含有温度控制模块的多功能检测仪器进行动力学检测：很多细胞类型可以在不依赖 CO₂ 的培养基配方中生长，并不会产生生理性损害。不依赖 CO₂ 的培养基避免了对气体控制模块的需要，并允许使用仅带有温度控制模块的仪器进行实时测量。在进行 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 检测前，需确认特定细胞系对不依赖 CO₂ 的培养基的耐受性和细胞对细胞毒性刺激的相对反应性。在没有提供合适湿度的环境中，进行多天实验时，应考虑“边缘效应”和 / 或板盖内表面的过度冷凝。

2. 在特定时间间隔多次检测：检测培养板应加盖在提供湿度的细胞培养箱中培养。待测细胞培养板在需要检测的指定时间点中从培养箱中取出检测发光和荧光后，再放回培养箱继续培养。尽量缩短检测板在培养箱外的时间，以减少温度变化对待测细胞和试剂的影响，并降低细胞污染的风险。

4. 操作步骤

4.A. 推荐的对照

- **无细胞对照 (No-cell controls)**：对于 96 孔板形式，加入 100 μ l 完全培养基和 100 μ l 2 \times 检测试剂 (2 \times Detection Reagent) 到复孔中。这些对照孔将确定在没有细胞的情况下，仅在培养基中由试剂产生的背景发光和荧光，并且可以指导仪器增益设置。从所有的测试样品孔中减去来自无细胞对照的背景发光和荧光值的平均值，以使检测数据归一化。无细胞孔中的发光值在大多数情况下是非常小的，但是由于选择的光电倍增管增益设置，荧光值也可能会很大。
- **无化合物对照 (仅有溶剂对照)**：对于 96 孔板形式，加入 50 μ l 完全培养基和匹配的溶剂到 50 μ l 培养细胞中。接下来，在每个无化合物对照孔中加入 100 μ l 的 2 \times 检测试剂。这些孔可获得在实验药物处理期间，溶剂相关 (通常是 DMSO)，无化合物处理的应答。所有测试样品应与实验药物处理期间的每个时间点的无化合物对照进行比较。
- **阳性对照化合物**：对于 96 孔板形式，添加 50 μ l 的化合物，到 50 μ l 培养细胞中，该化合物应是已知的能够在选定的细胞模型系统中，在已知浓度下诱导细胞凋亡 (或产生坏死)。接下来，在每个阳性对照孔中加入 100 μ l 的 2 \times 检测试剂。这些细胞孔在证明试剂有效性中十分有用，并可在研究未知化合物的发现过程中评估化合物的相对应答水平。这些细胞孔也可用于确定仪器的增益设置。

4.B. 准备 2 × 检测试剂 (2 × Detection Reagent)

注意:

我们推荐只准备即刻使用所需用量的 2 × Detection Reagent; 然而 2 × Detection Reagent 可被储存于室温、4°C 或 37°C 长达 18 小时, 而没有检测到试剂的功能损失。请勿储存制备好超过 18 小时的 2 × Detection Reagent。

在制备 2 × 检测试剂之前, 立即室温融化 Annexin V NanoBiT[®] 底物、CaCl₂ 和坏死检测试剂 (Necrosis Detection Reagent), Annexin V-LgBiT 和 Annexin V-SmBiT 融合蛋白应置于冰上。在解冻后, 简单地将所有试剂盒组分短暂离心, 以便于最大限度地保留试剂。按以下顺序添加组分。

用户如购买 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay (Cat.# JA1000, JA1001) 需要在第 4 步加入自己选择的坏死检测试剂, 或根据需要省去坏死检测试剂添加步骤。

1. 确定 2 × Detection Reagent 所需用量, 包括所有对照孔和检测孔。需要考虑在液体管和试剂槽中不可回收的液体损失。通常, 对于 96 孔板整板, 12ml 2 × Detection Reagent 已足够使用。
2. 将所需体积的完全培养基加入到带盖的无菌管中。使用预热的完全培养基将 1,000 × Annexin NanoBiT[®] 底物稀释 500 倍 (对于一个完整的 96 孔板, 每 12ml 加入 24 μl 底物)。立即涡旋混匀。
注意: (可选) 如果在具有动态检测功能和温度控制模块, 但没有配备 CO₂ 控制模块的多功能微孔板读数仪中进行实验, 使用预热的不依赖 CO₂ 的培养基 + 10% FBS 配置试剂。并使用不依赖 CO₂ 的培养基 + 10% FBS 用于后续步骤。
3. 使用预热的含有 Annexin V NanoBiT[®] 底物的培养基将 1,000 × CaCl₂ 稀释 500 倍 (对于一个完整的 96 孔板, 每 12ml 加入 24 μl)。立即涡旋混匀。
4. 按照 500 倍稀释比例, 加入 1,000 × Necrosis Detection Reagent。 (对于一个完整的 96 孔板, 每 12ml 加入 24 μl)。涡旋以确保溶液均一性。
5. 按照 500 倍稀释比例, 加入 1,000 × Annexin V-SmBiT 和 1,000 × Annexin V-LgBiT 至按照上述步骤 2-4 制备的含有底物、CaCl₂ 和 Necrosis Detection Reagent 的细胞培养基中。 (对于一个完整的 96 孔板, 每 12ml 加入两种蛋白各 24 μl)。小心颠倒混匀, 请勿涡旋和避免产生气泡!

注意: 通常, 在同一细胞孔中, 将 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 与其他细胞健康检测联合使用会带来好处。在多数情况下, 采用 2 × Detection Reagent 形式, 可以很容易将多重检测所用的终点法试剂加入到样品孔中 (参阅 6.C 部分)。对于使用低体积微孔板 (low-volume-plate) 应用时, 按照前述方式加入溶液后, 再加入多重试剂会超过细胞孔的容积, 请参阅 6.B 部分, 其中介绍了加入 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 组分的替代操作方法。

4.C. 检测操作步骤

使用 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 时，只要培养细胞和 2 × 检测试剂保持 1:1 的比例，2 × 检测试剂可以扩展至 384 孔板形式。下面举例操作步骤为标准 96 孔板推荐使用的体积提供指导。对于 384 孔形式，我们建议将液体体积和细胞数量减少到 96 孔形式中所需用量的大约 20 ~ 25%。

微孔板布局: 10,000 细胞 / 孔 (96 孔板) ; 2,500 细胞 / 孔 (384 孔板)												
化合物 2 倍连续梯度稀释, 10 个浓度点										0	0	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	对照化合物 (已知的凋亡诱导剂)										只有细胞 无化合物	无细胞 无化合物
B												
C												
D												
E	待测化合物										只有细胞 无化合物	无细胞 无化合物
F												
G												
H												

图 3. 微孔板布局举例。

- 收集细胞（贴壁依赖或贴壁不依赖），并用预热的完全培养基将细胞重悬至 200,000 细胞 /ml。
注意：
 - (可选)** 如果在具有动态检测功能和温度控制模块，但没有配备 CO₂ 控制模块的多功能微孔板读数仪中进行实验，使用预热的不依赖 CO₂ 的培养基 +10% FBS 配置试剂。并使用不依赖 CO₂ 的培养基 +10% FBS 用于后续步骤。
 - (可选)** 在特殊情况下，如在同一样品孔中加入终点法细胞健康检测试剂（如 CellTiter-Glo[®] Cell Viability Assay 或 Caspase-Glo[®] 3/7 Assay）时，细胞孔的体积可能不够大，可能需要直接向细胞中加入 2 × Detection Reagent 的组分，而不是配好 2 × Detection Reagent 再单独加入。请参阅附录中这种操作与标准步骤的差别（6.B 部分）。
- 在 96 孔板中，加入 50 μl 200,000 细胞 /ml 至孔 A1-H11（10,000 细胞 / 孔）。
- 在 96 孔板中，加入 50 μl 完全细胞培养基（无细胞）至第 12 列。该列为无细胞、无化合物对照。
注意： 如果细胞是贴壁的，将微孔板（盖上盖子）放回加湿组织培养箱，使细胞重新贴壁和恢复至少 3 至 4 小时。或者，可以在给药前一天晚上铺细胞板，以使细胞重新贴壁过夜。这种平衡 / 再贴壁期对于悬浮生长的细胞是不必要的。

4. 准备 2 个无菌 12- 通道加样槽（用于化合物梯度稀释），将 0.5ml 完全培养基加入到 12 通道槽的 2-12 通道中。准备 2 份 1ml 完全培养基，分别加入对照或待测化合物，化合物浓度为所需起始浓度的 4 倍（如：如果梯度稀释中所需的起始浓度为 $10\ \mu\text{M}$ ，则制备 $40\ \mu\text{M}$ 溶液）。可能需要在 DMSO 中进行化合物的中间稀释，以稀释至所需的 $4\times$ 起始浓度。在对应化合物稀释槽的通道 1 中加入 1ml 含有 $4\times$ 对照或 $4\times$ 待测化合物的完全培养基溶液。对于这两种化合物，均将 0.5ml 液体从通道 1 转移到通道 2，上下吹吸混合，然后将 0.5ml 液体从通道 2 转移到通道 3，以此类推，从通道 1 到通道 10 进行 10 个药物浓度点，两倍连续稀释。11 和 12 通道为“无化合物对照”（对应仅加入溶剂的完全培养基）。
5. 使用 12- 通道多通道移液器，将 12- 通道加样槽中对应的 $4\times$ 浓缩的两倍连续稀释、10 个药物浓度点的化合物溶液转移到含有细胞的 96 孔细胞培养板中相应的重复孔中，每个细胞孔中转移 $50\ \mu\text{l}$ 化合物溶液。（参见图 3 中的细胞培养板布局。）将对照化合物加入到 A-D 行对应中的复孔中，将待测化合物加入 E-H 行对应的复孔中。此时，每个细胞孔中液体体积应该为 $100\ \mu\text{l}$ 。确保遵循图 3 中的细胞培养板布局，并添加从高浓度到低浓度的化合物梯度（从第 1 列到第 10 列为最高浓度到最低浓度）。第 11 和 12 列应不含化合物（溶剂对照）。
6. 按照 4.B 部分准备 $2\times$ 检测试剂。
注意： 制备好 $2\times$ 检测试剂后，应立即进入步骤 7 以起始检测，记录为凋亡/坏死检测的起始时间 ($t=0$)。
7. 将 $100\ \mu\text{l}$ 在完全培养基中制备的 $2\times$ 检测试剂加入 96 孔板中的所有孔中。对于 96 孔板，所有孔中此时最终液体体积为 $200\ \mu\text{l}$ 。将该细胞培养板以 500-700rpm 速度在平板振荡器上的震荡混合约 30 秒。
8. 按照 3.E 部分中描述的三种方法之一孵育并记录发光和荧光测量值。

4.D. 数据分析

1. 计算来自第 12 列的平均发光信号（无细胞、无化合物背景对照；测量试剂固有的发光值）。从所有样品发光值中减去该信号以获得净相对发光单位。
注意：基于非光电倍增管（PMT）的仪器或 PMT 设置未经优化（或无法更改）的仪器，发光和荧光通道中的无细胞背景信号相对于实验信号可能是显著的，需经数学方法调整。有关指导，请参阅仪器使用说明书。
2. 计算来自第 12 列的平均荧光信号（无细胞，无化合物背景对照；测量试剂固有的荧光），并从荧光通道中的每个样品孔中减去该值以获得净荧光单位。
3. 使用商品化的曲线拟合软件（GraphPadPrism[®]，SigmaPlot[®] 等），对每个时间点净发光值（由 PS: Annexin V 结合产生）和净荧光值（由膜完整性的变化产生）与化合物浓度（在可能的情况下分析中包括未处理对照）作图。在特定化合物浓度下绘制净发光和净荧光信号与时间的曲线对数据分析也是有意义的。

4.E. 数据解释

细胞凋亡诱导剂

诱导细胞凋亡的化合物将产生时间和剂量依赖性的发光信号升高（Annexin V 融合蛋白与外翻的 PS 结合），发光信号的增加出现在由继发性坏死（膜完整性丧失）引起的荧光信号增加之前。信号出现的这种动力学差异是凋亡表型的标志。

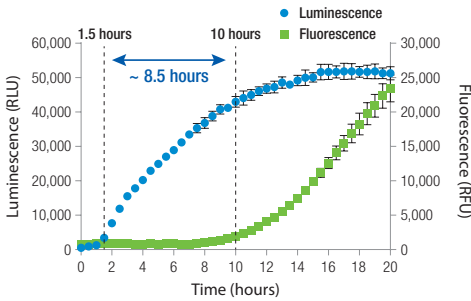
注意：在使用少于 500 个细胞 / 孔和 / 或产生相对较小的表型变化（<5% 细胞死亡）的细胞模型中，发光信号的固有灵敏度可以使由 annexin 结合产生的发光信号可被测量到，而无法检测到荧光信号的增加。由于检测方法固有的灵敏度差异，数据可能会倾向于被解释成细胞凋亡。在这些情况下，强烈建议使用正交方法来确定作用机制（参见 6.C 部分）。

引起细胞死亡的非凋亡诱导剂

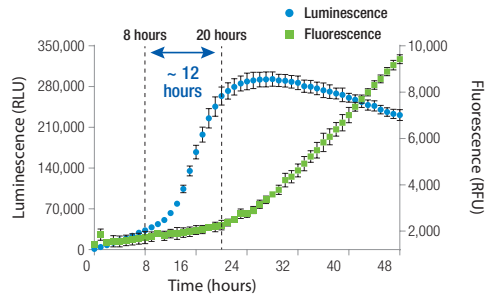
化合物引起的时间和剂量依赖性发光信号增加的同时荧光信号增加，与细胞凋亡机制不一致，而可能涉及其他形式的程序性细胞死亡。可以在同一孔中进行正交实验检测细胞凋亡标志物以确认细胞凋亡的发生，例如检测 caspase 活化（参见 6.C 部分）。

4.F. 示例数据

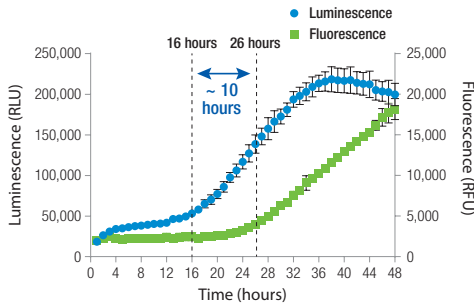
A. DLD-1 细胞: 400 ng/mL TRAIL 细胞凋亡的外源性诱导剂



B. K562 细胞: 1.1 μ M Bortezomib 细胞凋亡的内源性诱导剂



C. HepG2 细胞: 500nM 紫杉醇 细胞凋亡的内源性诱导剂



D. K562 细胞: 50 μ g/ ml Digitonin

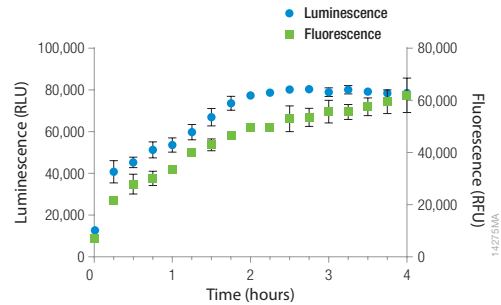


图 4. 连续重复测量发光信号 (RLU) 和荧光信号 (RFU), 有效反映了细胞毒性刺激物的动力学效应, 并有助于确认化合物作用机制。

图 A. 用 400ng/ml rhTRAIL 处理 DLD-1 细胞。

图 B. 用 1.1 μ M 硼替佐米 (Bortezomib) 处理 K562 细胞。

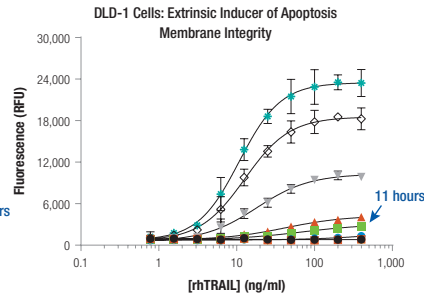
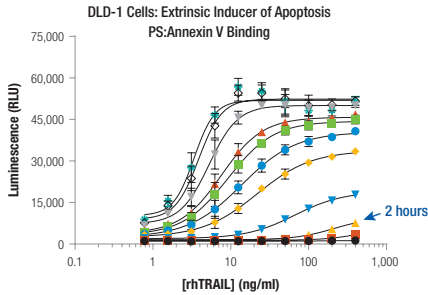
图 C. 用 500nM 紫杉醇 (paclitaxel) 处理 HepG2 细胞。

图 D. 用 50 μ g/ ml 洋地黄皂苷 (Digitonin) 处理的 K562 细胞。

图中展示了减去背景的发光 (蓝色圆圈) 和荧光 (绿色方块) 读数。对于图 A-C, PS:Annexin V 结合和膜完整性丧失之间存在显著的时间延迟, 其结果表明由于细胞凋亡导致继发性坏死。在图 D 中, 发光和荧光信号同时出现, 表明非凋亡表型。数据代表每个重复 4 个读数的平均值 \pm SD。

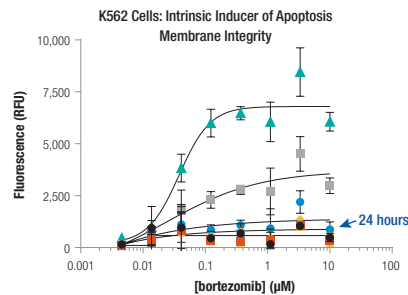
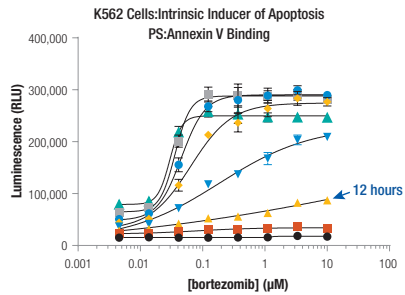
A. DLD-1 Cells

● 1 hour ▲ 2 hours ◆ 7 hours ■ 11 hours ▼ 15 hours ◆ 20 hours
 ■ 1.5 hours ▼ 3.5 hours ● 9 hours ▲ 12 hours ◇ 18 hours



B. K562 Cells

● 4 hours ▲ 12 hours ◆ 20 hours ■ 32 hours
 ■ 8 hours ▼ 16 hours ● 24 hours ▲ 44 hours



C. HepG2 Cells

● 4 hours ▲ 12 hours ◆ 18 hours ■ 24 hours ▼ 30 hours ◆ 40 hours
 ■ 7 hours ▼ 15 hours ● 21 hours ▲ 27 hours ◆ 36 hours ★ 48 hours

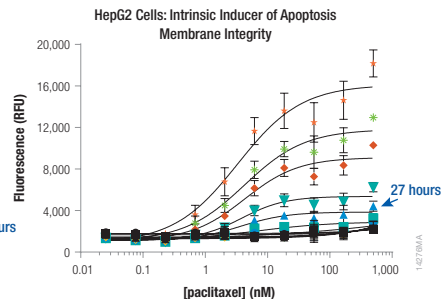
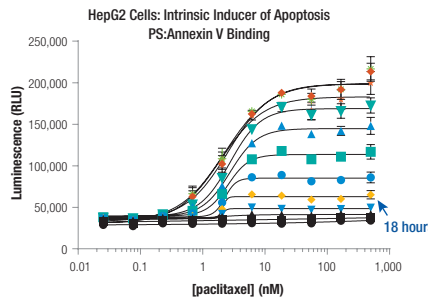


图 5. 在化合物处理期间重复测量发光信号和荧光信号，确定应答幅度和动力学效价。 在 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 试剂的存在下，分别用连续梯度稀释药物 rhTRAIL，硼替佐米 (bortezomib) 和紫杉醇 (paclitaxel) 处理。将细胞培养板放置在装有气体控制模块的微孔板检测仪中，于 37°C / 5% CO₂ 条件下孵育。在指定时间 (**图 A**) 检测收集 RLU (左图，PS:Annexin V 结合) 和 RFU (485nmEx/520-30nmEm) (右图，膜完整性) 或在 48 小时时长内每 60 分钟收集一次发光和荧光信号 (**图 B 和 C**)。数据代表每个重复 4 个读数的平均值 ± SD。

5. 参考文献

1. Martin, S., et al.(1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182, 1545–56.
2. Gidon-Jeangirard, C., et al.(1999) Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the release of CD4+ and PrPc+ membrane particles in a human T lymphocyte model.*J. Immunol.*162(10) 5712–18.
3. Monceau, V., et al. (2004) Externalization of endogenous annexin A5 participates in apoptosis of rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 64 (3), 496–506.
4. van Genderen, H.O., et al.(2008) Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two dimensional crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783, 953–63.

6. 附录

6.A. 影响实时信号强度和持续性的因素

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 经过配方优化，可在长达 48 小时内使信号强度与 PS 外翻程度成比例。仔细考虑标准光学约束条件并注意 PS 外翻过程中潜在的动力学差异可以改进发光和荧光检测效率。

光学考虑因素

生长或维持培养基中的酚红可作为荧光和发光的光学淬灭剂，降低光输出和检测的动态范围。尽管通常情况下是不必要的，但减少或不使用酚红可以改善该试剂盒的检测性能。

组织培养处理的全白微孔板或白色底部透明微孔板可应用于本试剂盒。与底部透明的白色微孔板相比，全白微孔板将产生更高强度的信号，并且可以改善动态范围。同样，检测中板盖可减少意外的环境污染和蒸发，但通常会降低激发和发射效率。尽管可以通过在数据收集期间移除微孔板盖子来改善信号强度，但是应该尽量缩短这种暴露时间。有时可能不需要移除板盖，这取决于所使用的微孔板检测仪的型号。

PS 外翻的动力学

由于原发性坏死，免疫细胞或抗体导致的细胞溶解功能，细胞凋亡或其他细胞死亡机制导致的 PS 外翻可能在（化合物）开始处理至 72 小时之间的任何时间发生。2× 检测试剂（2× Detection Reagent）中含有随时间缓释型的萤光素酶底物，该底物依赖于活细胞内固有的酯酶（esterase）活性。在大多数细胞类型中，大约需要 2 小时以稳定产生萤光素酶底物（来自底物前体），并以相对稳定的速率产生底物持续至少 48 小时。对于 PS 外翻的早期诱导剂，为获得最佳的发光信号响应，我们建议在凋亡诱导剂处理前 2 小时将 2× 检测试剂加入待测细胞。

诱导刺激的幅度和动力学也可能影响发光信号的持久性。极其有效的诱导物可以在短时间内（<3-6 小时）引起细胞死亡，可能会大幅度的限制发光信号在 48 小时的强度。对于在 48 小时附近或之后介导 PS 外翻的诱导物，可能需要应用未处理的对照发光信号将在每个时间点收集的数据进行标准化。在一些罕见的情况下，敏感细胞类型中，在 2× 检测试剂中添加的钙可能引起短暂的 PS 外翻，但不会导致细胞死亡。这种瞬时的外翻可能使数据解释复杂化。遇到这种情况，可以从 2× 检测试剂中省略添加外源钙的操作来解决这种影响。

6.B. 限制性体积的备选操作步骤

在替代方案中描述了当细胞孔的大小不足以容纳推荐体积时，如何加入 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 中的各组分。

必须对初始细胞密度进行必要的调整，以适应 48 小时药物处理过程中细胞增殖的需求和正常细胞健康的维持。体积减小的环境让细胞更容易受到营养物质的代谢消耗、废物的代谢积累、液体蒸发和人为的边缘效应等多种因素的影响。

1. 确定添加到对照和待测孔中的最终细胞体积。需考虑离心管和试剂加样槽等容器中存在的不可回收体积。通常，6ml 足以用于完整的 96 孔板。
2. 将所需体积的细胞以在完全培养基中 100,000-200,000 个细胞 / ml（对于 384 孔板为 125,000-250,000 个细胞 / ml）的密度分装至带盖的无菌混合容器（如离心管）中。向细胞中加入 1,000 × Annexin V NanoBiT® 底物，按照 500 倍稀释（对于完整的 96 孔板，每 6ml 加入 12 μl 底物）。颠倒混合。**不要涡旋。**
3. 向含有 Annexin V NanoBiT® 底物的细胞中加入 1,000 × CaCl₂，稀释度为 500 倍（对于完整的 96 孔板，每 6ml 加入 12 μl）。颠倒混合。**不要涡旋。**
4. 以 500 倍稀释度加入 1,000 × 坏死检测试剂（Necrosis Detection Reagent）（对于完整的 96 孔板，每 6ml 加 12 μl）。颠倒混合。**不要涡旋。**
5. 将 1,000 × Annexin V-SmBiT 和 1,000 × Annexin V-LgBiT 按 500 倍稀释加入到如上文步骤 2-4 中所述含有底物、CaCl₂ 和坏死检测试剂的细胞中（对于完整的 96 孔板，每 6ml 加入两种蛋白各 12 μl）。小心颠倒混合。**不要涡旋或产生气泡。**
6. 将 50 μl 2 × 细胞 / 试剂溶液加入 96 孔板的所有孔中（第 12 列除外）。
7. 向 1.0ml 完全培养基中加入 2 μl 坏死检测试剂，作为无细胞荧光试剂背景对照，向第 12 列的每个孔中加入 50 μl。
8. 将 0.5ml 完全培养基加入两个无菌 12 通道加样槽的 2-12 通道中，一个用于对照组，一个用于待测化合物。准备 2 份 1ml 完全培养基，分别加入对照或待测化合物，化合物浓度为所需起始浓度的 2 倍（如：如果梯度稀释中所需的起始浓度为 10 μM，则制备 20 μM 溶液）。可能需要在 DMSO 中进行化合物的中间稀释，以稀释至所需的 2 × 起始浓度。在对应化合物稀释槽的通道 1 中加入 1ml 含有 2 × 对照或 2 × 待测化合物的完全培养基溶液。从通道 1 到通道 10 进行 10 个药物浓度点，两倍连续稀释。11 和 12 通道为“无化合物对照”。
9. 使用 12- 通道多通道移液器，将 12- 通道加样槽中对应的 2 × 浓缩的两倍连续稀释、10 个药物浓度点的化合物溶液转移到含有细胞的 96 孔细胞培养板中相应的重复孔中，每个细胞孔中转移 50 μl 化合物溶液。参见图 3 中的细胞培养板布局。将对照化合物加入到 A-D 行对应中的复孔中，将待测化合物加入 E-H 行对应的复孔中。此时，每个细胞孔中液体体积应该为 100 μl。确保遵循图 3 中的细胞培养板布局，并添加从高浓度到低浓度梯度的化合物（从第 1 列到第 10 列为最高浓度到最低浓度）。第 11 和 12 列应不含化合物（溶剂对照）。
10. 按照 3.E 部分中描述的三种方法之一孵育并记录发光和荧光信号。

6.C. 和其他检测方法联用进行多重检测

Promega 的互补和 / 或正交细胞健康检测试剂可以与 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 联用，加入到同一细胞孔中。从这些检测获得的数据可揭示化合物与细胞毒性无关的抗增殖作用或为推定化合物的作用机制提供进一步证据。在大多数情况下，可以使用标准操作步骤加入这些检测试剂或对在每个孔中加入的试剂体积做少许调整。本附录描述了三种多重检测方案，作为如何应用多重检测试剂的示例：1) Caspase-Glo® 3/7 Assay; 2) CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay; 3) CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay。

注意： RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 是活细胞（非裂解）实时（动力学）测定。以下多重检测的实例是终点法检测。因此，在使用以下终点法多重检测试剂之前，必须首先进行 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 并动态监测和收集所需时间点的信号。

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 和 Caspase-Glo® 3/7 Assay 联合使用进行多重检测

Caspase-Glo® 3/7 Assay (Cat.# G8090, G8091, G8093, G8092) 测量细胞群体中 caspase-3/7 的活性（正交细胞凋亡生物标志物）。可测量的 caspase-3/7 活性的存在被认为是细胞凋亡表型的决定性因素，并且可用于澄清模棱两可的结果或提供证据以支持使用 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 获得的结果。

1. 应用 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 进行检测，并按照 4.C 部分所述监测 RLU (PS:Annexin 结合) 和 RFU (膜完整性)。在所需时长内，进行动态监测。对于 96 孔板，最终检测体积为 200 μ l / 孔。
2. 按照 Caspase-Glo® 3/7 检测试剂技术说明 #TB323 中的描述，配制 Caspase-Glo® 3/7 试剂。
3. 向 96 孔细胞检测板中的所有样品和对照孔中加入 100 μ l Caspase-Glo® 3/7 试剂。对于 96 孔板，每孔的最终检测体积现在应为 300 μ l / 孔。

注意：在已经含有 200 μ l 细胞 + 化合物 + RealTime-Glo™ Annexin V and Necrosis 检测试剂的孔中加入 100 μ l Caspase-Glo® 3/7 试剂，这与 Caspase-Glo® 3/7 技术说明中推荐的体积 1:1 的标准方案不同。尽管已经验证该调整可以产生稳健且可接受的结果，但用户也可以使用本技术手册第 6.B 部分中描述的使用限制性体积操作步骤来实现 1:1 的比例。

4. 在平板振荡器中以 300-500rpm 的速度振荡 30 秒，轻轻混合细胞孔中的内容物。根据细胞培养系统，在室温下孵育 30 分钟至 3 小时。
5. 使用发光检测仪记录发光信号。

注意：与 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 相关的任何发光信号都会被 Caspase-Glo® 3/7 试剂中的裂解性表面活性剂淬灭。因此，由多重检测产生的任何发光信号（高于未处理的细胞对照）直接归因于每种化合物浓度对应的 caspase 活性。

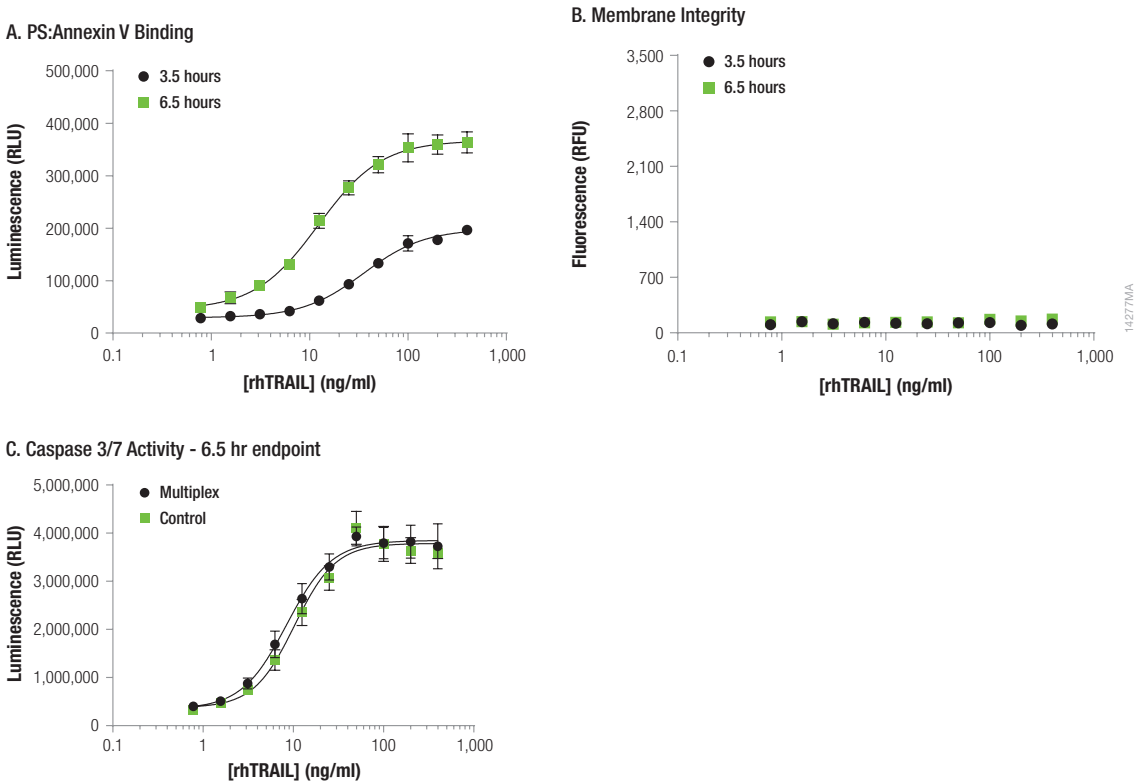


图 6. RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 和 Caspase-Glo® 3/7 Assay 联合使用进行多重检测结果示例。在 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 检测试剂存在下，使用 rhTRAIL 的梯度稀释液处理 DLD-1 细胞。将细胞培养板在 37°C / 5% CO₂ 下孵育并在 3.5 小时（黑色圆圈）和 6.5 小时（绿色方块）时间点检测发光信号（图 A，PS:Annexin V 结合）和荧光信号（485nmEx / 520-30nmEm）（图 B，膜完整性）。在 6.5 小时检测 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 读数后，按照第 6.C 部分所述，将 Caspase-Glo® 3/ 7 试剂加入细胞培养孔中进行多重检测（图 C，caspase-3/7 活性，黑色圆圈）。作为对照，在不存在 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 试剂的情况下，将平行孔中的 DLD-1 细胞使用相同浓度的 rhTRAIL 的梯度稀释液处理，并在 6.5 小时加入 100 μl Caspase-Glo® 3/ 7 试剂（图 C，caspase-3/7 活性，绿色方块）。Caspase-Glo® 3/ 7 试剂结果（图 C）表明多重检测和对照试验的信号幅度和效价值几乎一致，表明使用 Caspase-Glo® 3/ 7 试剂进行多重检测的化学兼容性和可直接在同一细胞孔中进行正交测定细胞凋亡。数据代表四个复孔读数平均值 ± SD。

6.C. 和其他检测方法联用进行多重检测（接上文）

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 和 CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay 联合使用进行多重检测

The CellTiter-Glo® 2.0 Assay (Cat.# G9241, G9242, G9243) 通过萤火虫萤光素酶反应检测活细胞中的 ATP。发光信号和活细胞数相关。

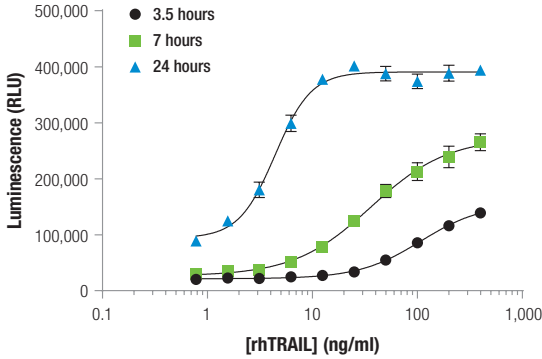
1. 应用 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 进行检测，并按照 4.C 部分所述检测发光和荧光信号。在所需时长内，进行动态监测。对于 96 孔板，最终检测体积为 200 μ l / 孔。
2. 按照 CellTiter-Glo® 2.0 Assay 技术说明 #TM403 中的描述，配制 CellTiter-Glo® 2.0 试剂。
3. 向 96 孔细胞检测板中的所有样品和对照孔中加入 100 μ l CellTiter-Glo® 2.0 试剂。对于 96 孔板，每孔的最终检测体积现在应为 300 μ l / 孔。

注意：在已经含有 200 μ l 细胞 + 化合物 + RealTime-Glo™ Annexin V and Necrosis 检测试剂的孔中加入 100 μ l CellTiter-Glo® 2.0 试剂，这与 CellTiter-Glo® 2.0 技术说明中推荐的体积 1:1 的标准方案不同。尽管已经验证该调整可以产生稳健且可接受的结果，但用户也可以使用本技术手册第 6.B 部分中描述的使用限制性体积步骤来实现 1:1 的比例。

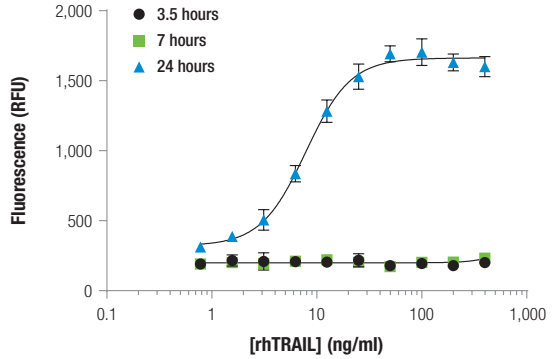
4. 在平板振荡器中以 300-500rpm 的速度振荡 30 秒，轻轻混合细胞孔中的内容物 2 分钟。在室温下孵育 10 分钟。
5. 使用发光检测仪记录发光信号。

注意：与 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 相关的任何发光信号都会被 CellTiter-Glo® 2.0 试剂中的裂解性表面活性剂淬灭。因此，由多重检测产生的任何发光信号直接归因于每种化合物浓度对应的 ATP 含量（活细胞）。

A. PS:Annexin V Binding



B. Membrane Integrity



C. Cell Viability (ATP Content) - 24 Hour Endpoint

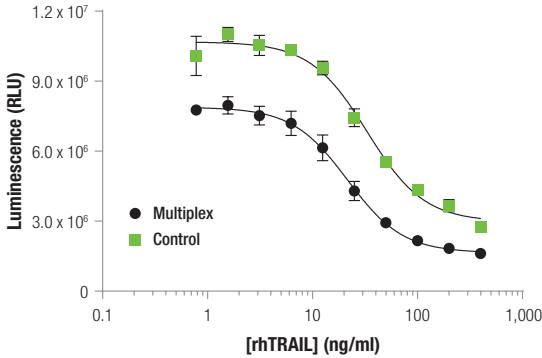


图 7. RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 和 CellTiter-Glo® 2.0 Assay 联合使用进行多重检测结果示例。 在 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 检测试剂存在或不存在的情况下，使用 rhTRAIL 的梯度稀释液处理 DLD-1 细胞。将细胞培养板在 37°C /5% CO₂ 下孵育并在 3.5 小时（黑色圆圈），6.5 小时（绿色方块）和 24 小时（蓝色三角）时间点检测发光信号（图 A，PS:Annexin V 结合）和荧光信号（485nmEx/520-30nmEm）（图 B，膜完整性）。在 24 小时检测 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 读数后，按照第 6.C 部分所述，将 CellTiter-Glo® 2.0 试剂（100μl）加入细胞培养孔中，在微孔板震荡仪震荡 2 分钟，室温孵育 10 分钟后进行多重检测（图 C，细胞活力，绿色方块），记录 RLU。尽管多重检测和对照试验的发光信号幅度有差别，但效价值一致，表明多重检测试剂的化学兼容性，同时可以确认细胞毒性。数据代表四个复孔读数平均值 ±SD。

6.C. 和其他检测方法联用进行多重检测（接上文）

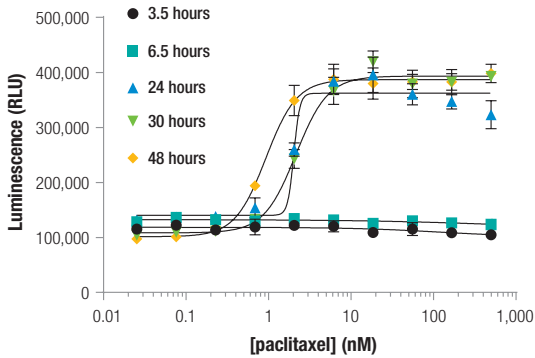
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 和 CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay 联合使用

CellTiter-Fluor™ Assay (Cat.# G6080, G6081, G6082) 是一种非裂解性、单一试剂加样的荧光法检测试剂盒，检测活细胞中保守的组成型蛋白酶活性，将活细胞蛋白酶作为细胞活力的标志物。活细胞蛋白酶活性仅存在于完整的活细胞中，通过细胞通透性且产生荧光的肽段底物（GF-AFC）进行检测。荧光信号的产生与活细胞数相关。

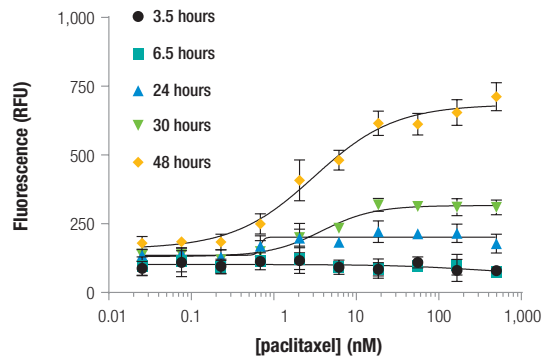
1. 进行 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 实验，根据 4.C 部分描述监测发光信号和荧光信号。在待检测时间点进行动态检测。
2. 根据 CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay 技术说明 #TB371 中的描述准备 5 × CellTiter-Fluor™ 试剂。例如，每 2ml 检测试剂中加入 10μl GF-AFC 底物。
3. 在 96 孔检测板的每个样品及对照孔中加入 40μl 5 × CellTiter-Fluor™ 试剂。
4. 使用平板震荡仪在 300–500rpm 转速下短暂混合细胞孔内的组分。在 37° C 孵育至少 30 分钟，但不要超过 3 小时。
5. 使用荧光检测仪器记录荧光（380–400nmEx/505nmEm）。合理调整仪器的增益设置。

注意：CellTiter-Fluor™ 试剂（GF-AFC）的激发 / 发射特性（380–400nmEx/505nmEm）不会与 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 中的坏死检测试剂（485nmEx/520–30nmEm）相互干扰。

A. PS:Annexin V 结合



B. 膜完整性



C. 细胞活力 (活细胞蛋白酶活性)

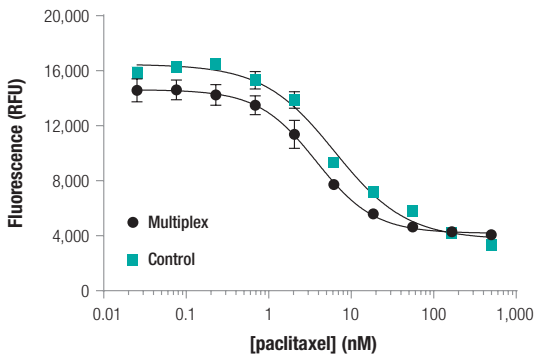


图 8. RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis 和 Necrosis Assay 和 CellTiter-Fluor™ Assay 进行多重检测的数据示例。 在存在或不存在 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 试剂的情况下，将 HepG₂ 细胞应用梯度稀释的紫杉醇 (paclitaxel) 处理。将细胞培养板置于 37°C / 5% CO₂ 培养，并在 3.5 小时 (黑色圆圈)、6.5 小时 (蓝色方块)、24 小时 (蓝色三角形)、30 小时 (绿色三角形) 和 48 小时 (橙色钻石) 时间点动态收集发光 (图 A, PS:Annexin V 结合) 和荧光 (485nmEx/520–30nmEm) (图 B, 膜完整性) 信号。在 48 小时 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 测定的基础上，根据 6.C. 部分描述，将 5 × CellTiter-Fluor™ 试剂添加到细胞培养孔中以进行多重检测 (图 C, 细胞活力, 黑色圆圈)。作为对照，在没有 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay 试剂的情况下，将 HepG₂ 细胞的平行孔经相同浓度的紫杉醇系列稀释液处理。CellTiter-Fluor™ 试剂 (40 μl) 在 48 小时内以终点的方式加入 (图 C, 细胞活力, 蓝色正方形)。多重和对照试验的信号幅度和效价值几乎一致，表明使用 CellTiter-Fluor™ 试剂进行多重检测的化学相容性和可用性。数据代表四个复孔读数平均值 ± SD。

6.D. 相关产品

实时检测试剂盒

产品	规格	货号
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	100 reactions	G9711
	10 × 100 reactions	G9712
	1,000 reactions	G9713

产品	规格	货号
CellTox Green™ Cytotoxicity Assay	10ml	G8741
	50ml	G8742
	100ml	G8743

Caspase 检测试剂盒

产品	规格	货号
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5ml	G8090
	10ml	G8091
	10 × 10ml	G8093
	100ml	G8092
Caspase-Glo® 2	10ml	G0940
Caspase-Glo® 6	10ml	G0970
Caspase-Glo® 8*	10ml	G8201
Caspase-Glo® 9*	10ml	G8211

* 提供其他规格包装

细胞活力检测试剂盒

产品	规格	货号
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	10ml	G9241
	100ml	G9242
	500ml	G9243
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10ml	G6080
	5 × 10ml	G6081
	2 × 50ml	G6082



多功能微孔板读数仪

产品	货号
GloMax [®] Discover System	GM3000
GloMax [®] Explorer System	GM3500

(a) 专利 U.S. Pat. No. 6,949,350.

(b) 专利申请中

(c) 专利 U.S. Pat. No. 8,809,529, European Pat. No. 2635582B1, 和其他专利以及在申专利

(d) 专利 U.S. Pat. Nos. 8,598,198、9,458,499 和其他专利以及在申专利

©2017 Promega Corporation。版权所有。

Caspase-Glo、CellTiter-glo、GloMax、NanoBIT 和 NanoLuc 是 Promega 公司的注册商标。CellTiter-Fluor、CellTox 和 RealTime-Glo 是 Promega 公司的商标。

Corning 和 Costar 是 Corning, Inc. 的注册商标。GraphPad Prism 是 GraphPad Software, Inc. 的注册商标。SigmaPlot 是 Systat Software, Inc. 的注册商标。

产品可能会被申请中或已授权的专利所覆盖, 或者可能有某些限制。更多信息请访问我们的网站。

所有价格及规格如有变动, 恕不另行通知。

产品信息有可能变更, 请联系 Promega 技术服务或访问 Promega 在线目录获得最新的 Promega 产品信息。