

Product Manual

产品说明书

产品货号:

PR01529

储运条件: 4 °C避光保存, 冰袋运输

产品简介:

All-in-One Apoptotic, Necrotic and Healthy Comprehensive Cell Status Kits Plus 是一款集成化细胞状态检测工具, 通过“磷脂酰丝氨酸(PS)外翻+膜完整性评估+全细胞核染色”的多参数荧光标记策略, 实现健康细胞、凋亡细胞与坏死细胞的同步区分及量化分析。其核心检测原理清晰互补:

(1) 针对凋亡细胞的 PS 外翻特性, 采用高亮度、光稳定性强的 488 标记 Annexin V, 在钙离子介导下与细胞表面暴露的 PS 特异性结合, 使凋亡细胞呈现绿色荧光, 同时提供适配基础研究的 FITC 及适合多色分析的 R-PE/APC 标记选项;

(2) 基于膜完整性差异, 坏死及晚期凋亡细胞的细胞膜破损, 允许高电荷核酸探针 EthD Gold 进入并结合 DNA, 产生红色荧光, 还提供适配基础研究 7-AAD 及 Draq 7;

(3) 借助 Hoechst 33342 蓝色染料的全细胞穿透性, 对所有细胞的细胞核进行普遍性染色, 作为细胞计数与定量校正的稳定内参;

相较于传统单一标记试剂盒, 本品优势显著: 多参数同步检测避免样本分批次处理的误差, 流式细胞仪象限分析可直观区分细胞类型 (Q3: 健康细胞、Q4: 早期凋亡细胞、Q1: 晚期凋亡细胞、Q2: 坏死细胞), 且兼容荧光显微镜下的形态学观察, 尤其适合动态追踪凋亡进程, 量化凋亡细胞、坏死细胞在全细胞群落中所占比例。其应用覆盖细胞生理状态基础研究、抗癌药/抗菌肽的疗效评估、肿瘤细胞凋亡机制解析及临床样本中细胞状态的辅助检测等场景。

细胞凋亡与坏死作为两类截然不同的细胞死亡方式, 其精准区分对生命科学研究与临床转化具有不可替代的价值。凋亡是主动有序的“细胞自杀”过程, 参与胚胎发育、组织稳态维持及免疫清除, 其过度激活或抑制与癌症、阿尔茨海默病等重大疾病密切相关; 坏死则由急性损伤触发, 伴随炎症反应, 是脓毒症、心肌梗死等疾病的核心病理特征; 而健康细胞的存活状态直接反映代谢功能与信号通路完整性, 是药物筛选的核心评估指标。传统检测工具常因单一标记局限, 难以同步获取三类细胞的量化数据, 导致研究效率受限。本试剂盒的创新性在于突破这一壁垒, 通过多参数协同的检测逻辑, 在同一体系中实现细胞状态的标准化、精准化分析, 不仅为揭示凋亡/坏死平衡失调的分子机制 (如线粒体通路调控) 提供可靠工具, 更能支撑药物诱导细胞死亡效率的量化评估, 同时为临床样本检测 (如肿瘤预后判断、感染性疾病诊断) 提供有力的技术支撑, 助力基础研究向临床应用的高效转化。

应用范围:

贴壁细胞或悬浮细胞中凋亡细胞、坏死细胞、健康细胞检测;

肿瘤研究、药物毒性评价、干细胞分化监控等领域, 尤其适合动态追踪凋亡进程 (如化疗药物诱导的细胞死亡模式)

产品特点:

1. 全状态同步检测: 一次实验覆盖凋亡、坏死、健康细胞状态, 避免传统单一标记局限性, 实现“三合一”精准区分;
2. 高效省时: 整体染色时间仅需 15 min, 远快于传统多步检测流程, 大幅提升实验效率;
3. 荧光强度优异: 488 荧光量子产率高, 光稳定性强, 确保凋亡细胞信号清晰;
4. 高特异性与灵敏度: EthD Gold 比 PI 或 EthD-I 更强的 DNA 结合亲和力和荧光量子产率, 减少假阳性;
5. 操作简便性: 一步染色即可完成多参数检测, 无需复杂预处理, 结果可直接通过流式散点图或显微图像量化;

注意事项:

- 1. 本实验中使用的细胞必须是未固定的细胞 488-Annexin V、FITC-Annexin V、Annexin V-R-PE、Annexin V-APC 和 EthD Gold 等均依赖于正常细胞中的完整细胞膜进行区分健康细胞与凋亡或坏死细胞。
- 2. 建议在实验中设置单染色的对照组，流式检测中用于调节补偿。
- 3. 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 4. 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明:

一、实验前准备

注：以下实验步骤以 PR01529 产品为例，仅供参考。

1. 试剂准备:

将试剂盒各组份恢复至室温(15~25 °C)，准备足量 PBS 缓冲液。

2. 仪器准备:

荧光显微镜：激发/发射波长 Ex/Em：350/461 nm、Ex/Em：549/648 nm、Ex/Em：650/660 nm；
流式细胞仪：检测通道激发/发射波长 Ex/Em：350/461 nm、Ex/Em：549/648 nm、Ex/Em：650/660 nm。

3. 对照组设置:

组别	Annexin V-APC	7-AAD	Hoechst 33342	样品细胞
空白对照	-	-	-	不做任何处理
阴性对照	+	+	+	不做任何处理
单阳对照 1	+	-	-	诱导剂处理后明显凋亡
单阳对照 2	-	+	-	诱导剂处理后明显凋亡
单阳对照 3	-	-	+	诱导剂处理后明显凋亡
实验组	+	+	+	实验组细胞

空白对照组：评估背景荧光干扰、检测细胞自身的自发荧光、流式检测中用于调节阈值和电压。

阴性对照组：排除染料的非特异性结合，验证染色的特异性。

单阳对照组：排除荧光串扰，校准信号强度参数、流式检测中调节补偿。

4. 细胞准备:

根据实验设计，对细胞进行相应的药物处理。

二、操作步骤

方案一：荧光显微镜检测（适用于悬浮细胞）

1. 收集与洗涤细胞:

- (1) 收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。
- (2) 1000 rpm，室温离心 5 min，小心吸弃上清液。
- (3) 加入 100 μL PBS 轻柔重悬细胞，进行洗涤。
- (4) 再次 1000 rpm，室温离心 5 min，彻底吸弃上清液。

2. 细胞重悬与计数:

- (1) 使用 PBS 重悬并细胞计数。
- (2) 取 5×10⁴ ~ 10⁵ 个细胞，1000 rpm 低速离心 5 min，去除 PBS。
- (3) 使用 100 μL 组分 A(1× Annexin V Binding Buffer)重悬。1000 rpm 低速离心 5 min，去除上清。

注：显微镜法对细胞密度要求不严格，只要实验组与对照组密度一致即可。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整，以显微镜下视野中细胞分布清晰可辨为宜。

3. 细胞染色：

(1) 取 100 μL 组分 A 重悬细胞，分别加入组分 B(Annexin V-APC)5 μL 、组分 C(7-AAD)1 μL 和组分 D(Hoechst 33342)1 μL ，轻轻吹打混匀。

(2) 室温避光孵育 15~30 min（孵育时间可根据预实验结果优化）。

4. 洗涤与重悬：

(1) 孵育结束后，1000 rpm，室温离心 5 min，收集细胞。

(2) 小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。

(3) 加入 100 μL 组分 A 轻柔重悬细胞，进行洗涤。

(4) 末次洗涤后，彻底吸净上清液，加入 100 μL 组分 A 重悬细胞，制成待测样品。

5. 显微镜观察与拍照：

(1) 96 孔板法：将 100 μL 细胞悬液加入 96 孔板中，静置片刻，待细胞自然沉降贴底后，置于荧光显微镜下观察。

(2) 载玻片法：取 20~30 μL 细胞悬液滴加于洁净载玻片上，轻轻盖上盖玻片，避免产生气泡，置于荧光显微镜下观察。

(3) 在预设的滤光片条件下，寻找细胞并分别拍摄。

Annexin V-APC 检测早期凋亡信号：选用 APC 通道(Ex/Em: 650/660 nm)或相应滤光片；

7-AAD 检测坏死细胞信号：选用 PI 或 Texas Red 通道(Ex/Em: 550/650 nm)或相应滤光片；

Hoechst 33342 检测健康细胞信号：选用 DAPI 通道(Ex/Em: 350/461 nm)或相应滤光片。

方案二：荧光显微镜检测（适用于贴壁细胞）

1. 细胞清洗：

(1) 直接在培养板中吸弃细胞培养液。

(2) 根据培养板规格，加入对应体积的组分 A 轻柔洗涤细胞一次（例如：96 孔板加 100 μL /孔，48 孔板加 150 μL /孔，24 孔板加 250 μL /孔，12 孔板加 500 μL /孔，6 孔板加 1 mL/孔）。洗涤后吸净组分 A。

2. 制备染色工作液：

(1) 根据样品孔数，取适量体积的组分 A，按照每 100 μL 中三种染料分别为组分 B 5 μL 、组分 C 1 μL 和组分 D 1 μL 的使用量将染料加入到组分 A 中，混匀备用（现用现配）。例如，为 1 个 96 孔板染色，需配制 10.7 mL 工作液（10 mL 组分 A+ 500 μL 组分 B+100 μL 组分 C+100 μL 组分 D）。

3. 细胞染色：

(1) 向各孔中加入对应体积的染色工作液（体积同步骤 1(2)，例如：96 孔板加 100 μL /孔，48 孔板加 150 μL /孔，24 孔板加 250 μL /孔，12 孔板加 500 μL /孔，6 孔板加 1 mL/孔）。

(2) 室温避光孵育 15~30 min（孵育时间可根据预实验结果优化）。

4. 洗涤：

(1) 孵育结束后，吸弃各孔中的染色工作液。

(2) 按步骤 1(2)的体积，加入组分 A(1 $\times$ Annexin V Binding Buffer)洗涤细胞，清洗后吸去清洗缓冲液。

5. 显微镜观察与拍照：

(1) 洗涤后，每孔加入对应体积的组分 A，以保持细胞湿润。

(2) 直接将培养板置于荧光显微镜下观察和拍照。滤光片设置同方案一。

Annexin V-APC 检测早期凋亡信号：选用 APC 通道(Ex/Em: 650/660 nm)或相应滤光片；

7-AAD 检测坏死细胞信号：选用 PI 或 Texas Red 通道(Ex/Em: 550/650 nm)或相应滤光片；

Hoechst 33342 检测健康细胞信号：选用 DAPI 通道(Ex/Em: 350/461 nm)或相应滤光片。

方案三：流式细胞仪检测（适用于悬浮与贴壁细胞）

1. 收集与制备单细胞悬液：

悬浮细胞：同“方案一”的步骤 1 和 2，最终，最终取 $5 \times 10^5 \sim 10^6$ 个细胞。

贴壁细胞：

a.将细胞培养基吸出至适合的离心管内备用。贴壁细胞用少量 PBS 清洗一遍，清洗后的 PBS 吸出后同样转移到盛装培养基的离心管内，1000 rpm，室温离心 5 min。

b.加入适量不含 EDTA 的胰酶消化液（覆盖细胞即可），室温下置于显微镜下观察，待细胞变圆、间隙增大时，用移液器轻轻吹打，使细胞完全脱落。

注：胰酶消化步骤对于贴壁细胞很关键。消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落容易造成机械损伤，导致细胞凋亡的假阳性；消化时间过长，同样会造成细胞凋亡的假阳性，影响细胞膜上 PS 与 Annexin V 的结合干扰细胞凋亡的检测。

c.关键：加入“a 步骤”离心管内备用的细胞培养基，终止消化。

注：离心管内备用的细胞培养基非常重要，不能直接丢弃，其中会含有已经凋亡或坏死的细胞，且细胞培养基中的血清能够有效终止胰酶的消化作用，否则残留胰酶将会严重影响后续的凋亡检测。

d.将细胞悬液转移至合适的离心管，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清。

e.收集 a 步骤与 d 步骤中的细胞；

f.用 PBS 重悬细胞并进行细胞计数；

g.取 $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 个细胞，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清；

h. 100 μ L 组分 A 清洗细胞，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清。

2. 细胞染色：

(1) 用 100 μ L 组分 A 重悬细胞。

(2) 加入组分 B(Annexin V-APC)5 μ L、组分 C(7-AAD)1 μ L 和组分 D(Hoechst 33342)1 μ L。

(3) 室温避光孵育 15~30 min（孵育时间可根据预实验结果优化）。

3. 洗涤与重悬：

(1) 孵育结束后，1000 rpm，室温离心 5 min，收集细胞。

(2) 吸弃上清液，加入 100 μ L 组分 A 轻柔重悬，进行洗涤。

(3) 再次离心，彻底吸弃上清液。

(4) 加入 500 μ L 组分 A 轻柔重悬细胞，制成流式上机样品。

4. 上机检测：

(1) 重要：染色完成后 1h 内进行流式检测，以保证荧光信号稳定。

(2) 用流式细胞仪在预设的检测通道下进行分析。

(3) 首先通过空白对照（未染色细胞）调节电压，使细胞群位于坐标系左下角。

(4) 然后检测阴性对照和阳性对照，确认实验体系成立。

(5) 最后检测实验样品，记录并分析细胞的平均荧光强度。

Annexin V-APC 检测早期凋亡信号：选用 APC 通道(Ex/Em：650/660 nm)

7-AAD 检测坏死细胞信号：选用 PC5.5 通道(Ex/Em：550/650 nm)

Hoechst 33342 检测有核细胞信号：选用 DAPI 通道(Ex/Em：350/461 nm)

三、 结果判读：

1. 定性分析（显微镜）

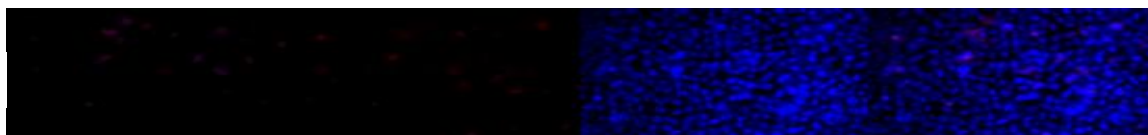
Annexin V-APC

7-AAD

Hoechst 33342

Merge

阴性对照



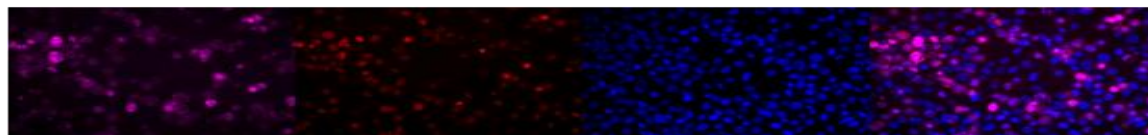
A

B

C

D

阳性对照



E

F

G

H

图 1.All-in-One Apoptotic, Necrotic and Healthy Comprehensive Cell Status Kits Plus (以 PR01529 为例) 荧光镜检拍照
(1) 阴性对照: K562 正常细胞, 进行 Annexin V-APC(A)、7-AAD(B)、Hoechst 33342(C)共染后合成画面(D);
(2) 阳性对照: 诱导凋亡处理后 K562 细胞, Annexin V-APC(E)、7-AAD(F)、Hoechst 33342(G)共染合成画面(H)。

结果判读:

1. 早期凋亡细胞: 细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻(PS)显著 (Annexin V-APC 远红荧光信号强);
2. 膜破损的凋亡晚期细胞: Annexin V-APC 远红荧光+ 7-AAD 红色荧光+ Hoechst 33342 蓝色荧光;
3. 坏死细胞: 仅 7-AAD 红色荧光信号;
4. 健康细胞: 红/远红荧光双阴性, 蓝色细胞核荧光均匀染色。

在经过凋亡诱导处理后, 与阴性对照相比 PS 外翻水平显著增加 (远红荧光亮度、细胞个数显著增强), 表明细胞膜 PS 外翻显著。晚期凋亡细胞比例明显增加 (远红荧光/红色荧光强度/蓝色荧光、三阳细胞个数显著增多), 表明药物促进了细胞的凋亡进而导致细胞死亡。

注: 实际检测结果可能因检测仪器、操作条件、细胞类型等差异产生不同, 本示例仅提供参考。

2. 定量分析 (流式细胞仪):

以 FSC-SSC 构建散点图, 来确定细胞群, 再以 Hoechst 33342-SSC 构建散点图, 排除细胞碎片; 以 Annexin V-APC 为 X 轴, 7-AAD 为 Y 轴, 将完整细胞群分为 4 个群体:

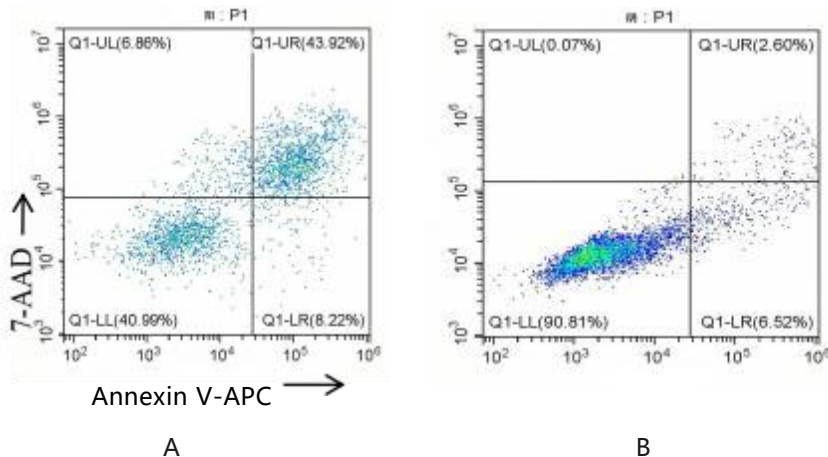


图 2.All-in-One Apoptotic, Necrotic and Healthy Comprehensive Cell Status Kits Plus (以 PR01529 为例) 流式细胞术分析
本实验以 K562 细胞为样本, 以凋亡诱导组为阳性处理组 (图 2.A), 以未处理组为阴性对照 (图 2.B), 对 K562 细胞处理后染色, 进行流式上机检测。

结果判读 1: 以图 2.A 为例: 可以区分出健康细胞 (左下)、早期凋亡细胞 (右下)、晚期凋亡 (右上)、坏死细胞 (左上)。

结果判读 2: 对 K562 细胞进行凋亡诱导后, 凋亡细胞的比例显著高于阴性对照; 健康细胞比例显著低于阴性对照 (见图 2.A、图 2.B)。

通过比较阳性组与阴性组在一、四象限的占比, 分析药物或者基因是促进细胞凋亡还抑制凋亡。数据大于对照组就是促进凋亡, 小于对照组则为抑制凋亡。