快速染色 Annexin V-PE/Draq（Hochest 33342）细胞凋亡试剂盒

货号：AF2122

储存条件：4℃避光冷藏，请勿冻存。

组分	10T	50T	100T
A. 1×Annexin V 结合缓冲液	5 mL	2*50 mL	4*50 mL
B. Annexin V-R-PE	50 μL	250 μL	500 μL
C. Draq 7	100 μL	500 μL	1 mL
D. Hoechst 33342	10 μL	50 μL	100 μL

注：试剂盒使用次数为进行 96 孔板荧光显微镜检测时可检测的微孔总数。

光谱特性 Annexin V-R-PE：Ex/Em=488/578 nm，Draq7：Ex/Em=599~644/678~697 nm，Hoechst 33342 Ex/Em：350/461 nm(with DNA)。

产品介绍

快速染色 Annexin V-PE/Draq (Hochest 33342) 细胞凋亡试剂盒是一体化细胞状态检测试剂盒，采用 PS 外翻 + 膜完整性评估 + 全细胞核染色多参数荧光标记策略，可同步区分并定量健康、凋亡与坏死细胞。利用 R-PE 标记 Annexin V 识别凋亡细胞，Draq7 标记膜破损的坏死 / 晚期凋亡细胞，Hoechst 33342 对全部细胞核染色作为内参 。

相比传统单标记试剂盒，它可规避分批处理样本的误差，适配流式与荧光显微镜检测，能动态追踪凋亡进程。适用于细胞生理基础研究、药物疗效评价、细胞死亡机制解析及临床样本辅助检测，可精准量化三类细胞比例，助力基础研究向临床转化。

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 15min，远快于传统多步检测流程，大幅提升实验效率；荧光强度优异
3. 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，Annexin V-R-PE 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

使用方法

一、实验前准备

将试剂盒各组分恢复至室温(15~25°C)，准备足量 PBS 缓冲液。

1、对照组别设置：

组别	Annexin V-R-PE	Draq7	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。

2. 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) 1000rpm，室温离心 5min，小心吸弃上清液。

(3) 加入 100uL PBS 轻柔重悬细胞，进行洗涤。

(4) 再次 1000rpm，室温离心 5min，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 $5x10^4$~10^5 个细胞，1000 rpm 低速离心 5 min，去除 PBS。

(3) 使用 100uL 组分 A (1x 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 100uL 组分 A 重悬细胞，分别加入组分 B(Amexin V-R-PE)5 uL、组分 C(Draq7)1 uL 和组分 D(Hoechst 33342) 1 uL，轻轻吹打混匀。

(2) 室温避光孵育 15~30min(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，1000rpm，室温离心 5min，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 100uL 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 100L 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 uL 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 uL 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。

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 100uL/孔，48 孔板加 150uL/孔，24 孔板加 250uL/孔，12 孔板加 500uL/孔，6 孔板加 1mL/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 100uL 中三种染料分别为组分 B 5uL、组分 C 1uL 和组分 D 1uL 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 10.7mL 工作液(10mL 组分 A+500uL 组分 B+100uL 组分 C+100uL 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 100uL/孔，48 孔板加 150uL/孔，24 孔板加 250uL/孔，12 孔板加 500uL/孔，6 孔板加 1mL/孔)。

(2) 室温避光孵育 15~30min(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 (1xAnnexin 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。

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，最终取 $5x10^5$~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，1000rpm，室温离心 5min。

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 AnnexinV 的结合干扰细胞凋亡的检测。

c. 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目的细胞，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，1000rpm，室温离心 5min，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 $5x10^4$~10^5 个细胞，1000rpm，室温离心 5min，吸弃上清；
h.100uL 组分 A 清洗细胞，1000rpm，室温离心 5min，吸弃上清。
2. 细胞染色：
(1) 用 100uL 组分 A 重悬细胞。
(2) 加入组分 B (Annexin V-R-PE)5 uL、组分 C(Draq)1 uL 和组分 D(Hoechst 33342)1 uL。
(3) 室温避光孵育 15~30min (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，1000rpm，室温离心 5min，收集细胞。
(2) 吸弃上清液，加入 100uL 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 500uL 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。