

BF™ 594-Annexin V/Hoechst 33342 Apoptosis Kits

15 min 一步双染，红蓝双光同步成像计数，精准鉴定健康、凋亡细胞

产品货号： C21407

产品规格： 10 T, 50 T, 100 T

储运条件： 4 °C避光保存，冰袋运输

产品简介：

BF™ 594-Annexin V/Hoechst 33342 Apoptosis Kits是一款集成化细胞凋亡检测工具，通过“磷脂酰丝氨酸（PS）外翻+全细胞核染色”的双参数荧光标记策略，实现健康细胞、凋亡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BF™ 594 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，使凋亡细胞呈现红色荧光，

（2）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；

（3）1×Annexin结合缓冲液则为反应提供适宜的pH值与离子强度，保障蛋白结合活性与荧光稳定性。

相较于传统检测工具，本试剂盒不仅省去多组分自行配制的烦琐流程，流式细胞仪象限分析可直观区分细胞类型：凋亡细胞、健康细胞，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，量化凋亡细胞在全细胞群落中所占比例。BF™ 594 标记技术降低非特异性结合、信号持久（荧光基团抗淬灭能力强）、适配性广等特点，广泛应用于流式细胞术、荧光显微镜观察、药物筛选中的凋亡评估及细胞生物学基础研究等场景。

细胞凋亡的异常调控与肿瘤、神经退行性疾病等重大疾病密切相关，精准检测凋亡过程是解析疾病机制、开发治疗药物的关键环节。本试剂盒凭借双荧光标记优势，在多个研究场景中发挥重要作用：流式细胞术可实现凋亡细胞的定量分析，在荧光显微镜下能直观观察细胞凋亡形态变化，在药物筛选中可快速评估候选药物的促凋亡或抗凋亡活性，同时也适用于细胞生物学基础研究中凋亡通路的机制探索。其为凋亡相关研究提供了可靠的检测依据，助力科研人员高效获取准确数据，对推动疾病机制研究与临床转化具有重要的实用价值。

应用范围： 活细胞凋亡过程实时动态观察；各类细胞常规凋亡快速检测；药物/应激条件下凋亡活性筛查与定量；凋亡与坏死、细胞周期多指标联合检测；凋亡通路机制及疾病模型验证研究；

产品特点：

- **光信号抗干扰能力强：** BF™ 594-Annexin V 的红色信号（发射波长 617 nm）可规避细胞自发荧光的干扰，Hoechst 33342 的蓝色信号（发射波长 461 nm）与红色信号波段差异显著，双信号无重叠，检测结果误判率低；
- **单细胞分辨率：** 能够提供单个细胞的详细信息；
- **适配多类检测平台：** 支持荧光显微镜观察（定位凋亡细胞）与流式细胞仪分析（定量凋亡率）；
- **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；
- **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，大幅提升实验效率染色时间；
- **荧光强度优异：** BF™ 594 光稳定性强，确保凋亡细胞信号清晰。

产品参数：

- **BF™ 594-Annexin V Ex/Em:** 590/617 nm；
- **Hoechst 33342 Ex/Em:** 350/461 nm（结合 DNA）；

产品组分：

组分	10 T	50 T	100 T
A. 1×Annexin V Binding Buffer	5 mL	2×50 mL	3×50 mL



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
 技术咨询 Contact@probelives.com
 订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
 英文网址 www.probelives.com
 Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

B. BFTM 594-Annexin V	50 μ L	250 μ L	500 μ L
C. Hoechst 33342	10 μ L	50 μ L	100 μ L

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。

注意事项：

- 使用贴壁细胞进行实验时，使用胰酶进行消化后的细胞，必须使用含有血清的培养基中和并去除胰酶，否则胰酶将会降解 Annexin V，导致染色失败。
- 本实验中不建议使用甲醛固定细胞，Annexin V 依赖于正常细胞中的完整细胞膜进行染色。若需固定需添加氯化钙。
- 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。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 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

1. 试剂准备：

- 将试剂盒各组分恢复至室温，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：590/617 nm Ex/Em：350/461 nm；
- 流式细胞仪：检测通道激发/发射波长 Ex/Em：590/617 nm Ex/Em：350/461 nm。

3. 对照组设置：

组别	BFTM 594-Annexin V	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
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。

2. 细胞重悬与计数：

- (1) 使用 PBS 重悬并细胞计数。
- (2) 取 5×10^4 - 10^5 个细胞，1000 rpm 低速离心 5 min，去除 PBS。
- (3) 使用 100 μ L 组分 A (1 $\times$ 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) 使用100 μL 组分A (1 $\times$ Annexin V Binding Buffer)重悬细胞，加入5 μL 组分B (BF™ 594-Annexin V)，加入1 μL 组分C (Hoechst 33342)，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）。

注：各染料的使用量可以根据不同的细胞种类、预实验或实验条件设置的使用量进行调整。

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 100 μL 组分 A 轻柔重悬细胞，进行洗涤，离心，吸净上清液。
- (4) 加入 100 μL 组分 A 轻柔重悬细胞，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。

注：细胞悬液使用量可以根据细胞计数的数量自行调整，显微镜视野中细胞分布 70%-80%为最佳。

- (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) 分别在预设的滤光片条件下，寻找并分别拍摄。

方案二：荧光显微镜检测（适用于贴壁细胞）

1. 细胞处理：

- (1) 提前一天在孔板中接种细胞，使得细胞汇合度达到70%-80%，待细胞贴壁后按照实验设计处理细胞。

2. 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。

3. 制备染色工作液：

- (1) 按照每100 μL 中两种染料分别为5 μL 组分B，1 μL 组分C的使用量将染料加入到组分A中，混匀备用。

注：各染料的使用量可以根据不同的细胞种类、预实验或实验条件设置的使用量进行调整。

4. 细胞染色：

- (1) 向各孔中加入对应体积的染色工作液（体积同步步骤1，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）。

5. 洗涤：

- (1) 孵育结束后，吸弃各孔中的染色工作液。
- (2) 按步骤2的体积，加入组分A洗涤细胞。

6. 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。

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，最终取 5×10^4 - 10^5 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 5min。

b.加入适量不含 EDTA 的胰酶消化液消化细胞。

注：胰酶使用量、消化时间、消化温度根据各自实验室的经验操作。

c.关键：加入“a 步骤”离心管内备用的细胞培养基，终止消化。

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 5×10^4 - 10^5 个细胞，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清；



h.100 μ L 组分 A (1 $\times$ Annexin V Binding Buffer)清洗细胞, 1000 rpm, 室温离心 5 min, 吸弃上清;

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。

2. 细胞染色:

- (1) 用100 μ L组分A重悬细胞;
- (2) 加入5 μ L组分B (BFTM 594-Annexin V), 加入1 μ L组分C (Hoechst 33342), 轻轻吹打混匀;
- (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) 加入100 μ L组分A轻柔重悬, 洗涤2-3次, 1000 rpm, 室温离心5 min, 吸弃上清。
- (3) 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1 h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。

三、结果判读:

1. 定性分析 (显微镜):

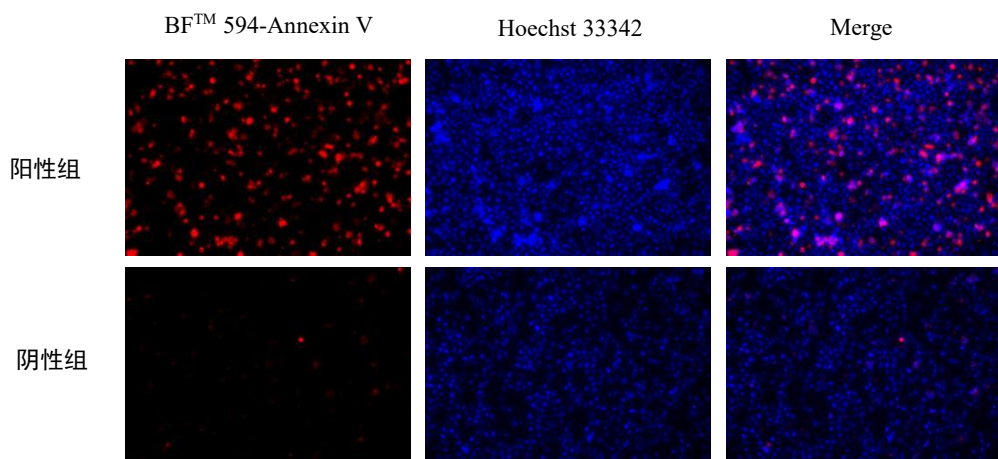


图 1. BFTM 594-Annexin V/Hoechst 33342 Apoptosis Kits 荧光镜检拍照

- (1) 阴性组: K562正常细胞, 进行BFTM 594-Annexin V、Hoechst 33342同时共染后合成Merge。
- (2) 阳性组: 诱导凋亡处理后的K562细胞, 进行BFTM 594-Annexin V、Hoechst 33342同时共染后合成Merge。

结果判读: 凋亡细胞: BFTM 594-Annexin V将细胞膜染成红色荧光、Hoechst 33342将细胞核染成蓝色; 健康细胞: 仅有蓝色荧光。在经过凋亡诱导处理后, 与阴性对照相比磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻水平显著增加 (红色荧光亮度、细胞个数显著增强), 表明药物促进了细胞凋亡。

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）：

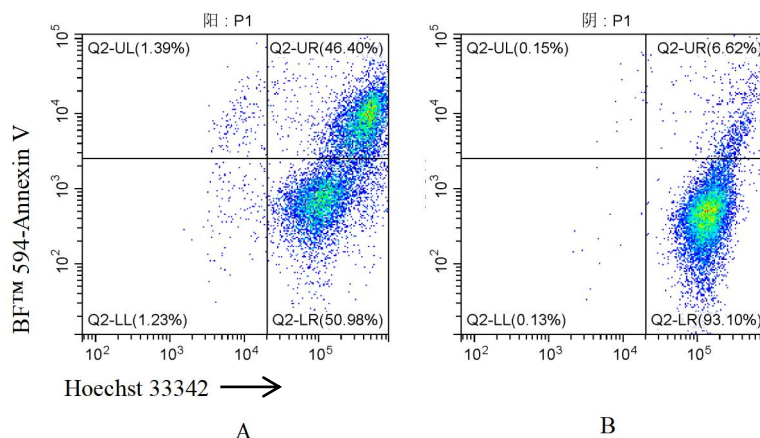


图 2. BFTM 594-Annexin V/Hoechst 33342 Apoptosis Kits 流式分析

本实验以 K562 细胞为样品，进行凋亡诱导处理，以凋亡诱导组为阳性处理组（图 A），以未处理组为阴性对照（图 B），对 K562 细胞处理后染色，进行流式上机检测。

结果判读：以图 A 为例：可以区分出活细胞（右下）、凋亡细胞（右上）；在经过药物处理后，凋亡细胞显著高于对照组，表明药物促进了细胞凋亡。

注：实际检测结果可能因检测仪器、操作条件等差异产生不同，本示例仅供参考。

常见疑问与解答：

- 问：可以在染色前或染色后使用固定细胞吗？

答：要观察凋亡细胞的不同状态，只能用活细胞诱导凋亡后进行检测。如果将细胞进行固定，细胞在固定过程中将全部死亡，染色结果将出现大量的假阳性凋亡或信号。

- 问：使用贴壁细胞进行流式检测时为什么要保留培养细胞的培养基？

答：药物处理后的细胞已经存在凋亡细胞，这些细胞的贴壁能力逐渐降低，会游离在培养基中，染色检测时需将这部分细胞考虑进去，否则检测结果可能凋亡或坏死细胞的比例比较低，对药物效果或者细胞处理效果的评价产生错误判断；且细胞培养基中含有的血清能够高效的中和胰酶，残留的胰酶会降解后续染色过程中的 Annexin V，导致染色失败。

