

Chromatin Condensation/Plasma-Membrane Permeability/Dead-Cell Apoptosis Detection Kits

细胞全状态 10 min 快速检测，一次染色解锁健康、凋亡和死亡 3 种细胞群

产品货号： C21608

产品规格： 10 T, 100 T, 500 T

储运条件： 4℃避光保存，冰袋运输

产品简介：

本染色质浓缩/膜通透性/死细胞凋亡检测试剂盒（Hoechst 33342, YO-PRO™-1, EthD Gold）是一款兼容性极强的高性能、适合高通量筛选的凋亡检测工具。其核心原理基于三种特异性染料的协同靶向作用：

- (1) Hoechst 33342 可穿透完整细胞膜，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；
- (2) YO-PRO™-1 又名恶唑黄(Oxazole Yellow)，是一种非细胞膜穿透性的并对DNA具有高亲和力的羧花青单体绿色荧光染料，能特异性进入凋亡细胞膜通透性轻度增加的细胞，与核酸结合后发出强荧光，实现凋亡细胞的精准标记；
- (3) EthD Gold仅能穿透细胞膜破损死细胞，完成对该类细胞的特异性识别。

相较于市面上广泛应用的YO-PRO™-1 与PI（碘化丙啶）组合，PI虽与EthD Gold一样标记膜破损细胞，但存在：

- (1) PI对胞外核酸、细胞碎片的非特异性结合率高，背景荧光高，在复杂样本中精准度不足；
- (2) 该组合缺乏核特异性内参染料，无法校正细胞总数，导致定量结果偏差。

本试剂盒以EthD Gold替代PI，优化染料光谱兼容性与特异性，背景荧光更低、信号更纯净，搭配Hoechst 33342 的内参作用，有效解决上述局限，实现活细胞、凋亡细胞、死细胞的清晰区分与准确定量。产品操作便捷，无需复杂样品预处理，染色流程高效，且与荧光显微镜、流式细胞仪、微孔板读板仪等各类荧光检测仪器高度兼容。

细胞凋亡是生命活动中高度保守的程序性细胞死亡过程，其调控网络的失衡与癌症、神经退行性疾病、自身免疫性疾病、心血管疾病等多种重大疾病的发生发展密切相关，精准解析其状态及进程是揭示疾病发病机制、开发靶向治疗药物、评估治疗效果的核心前提。传统凋亡检测中广泛应用的YO-PRO™-1 与PI组合，因存在特异性不足、信号干扰等问题，难以满足科研对检测精准性与全面性的需求，而本试剂盒通过科学搭配YO-PRO™-1、EthD Gold及Hoechst 33342 三种功能互补的染料，优化反应体系，不仅能特异性捕捉染色质浓缩、细胞膜通透性变化等凋亡关键特征，更能实现对凋亡全进程的动态追踪与定量分析，广泛适用于细胞凋亡机制研究、药物筛选与毒性评估、肿瘤生物学研究、免疫细胞功能分析、高通量筛选等多个科研场景，为培养细胞、原代细胞、肿瘤细胞系等不同样本类型的凋亡检测提供稳定可靠的解决方案。

注：效能等同 Thermo Fisher Chromatin Condensation/Membrane Permeability/Dead Cell Apoptosis Kit with Hoechst 33342/YO-PRO™-1 and PI for Flow Cytometry（V23201）。

注：本文中 YO-PRO®为赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)的商标及注册商标。

注：YO-PRO™-1 别称恶唑黄(Oxazole yellow)。

应用范围：细胞凋亡机制研究（解析凋亡特征、定量凋亡/坏死比例）、药物研发（高通量药物筛选、药物毒性评估）、肿瘤生物学（肿瘤细胞凋亡机制/治疗效果评估）、免疫细胞功能分析（免疫细胞凋亡水平检测）、疾病机制研究（神经退行性疾病/心血管疾病/自身免疫病相关细胞凋亡分析）

产品特点：

- **活细胞免固定检测：**活细胞适用，无需细胞固定步骤；
- **同步检测：**同时检测凋亡细胞、死细胞及健康细胞；
- **快速可视化核形态：**5 min 一步染色，直观地观察到凋亡细胞核的形态变化；
- **荧光强度优异：**EthD Gold 荧光强度相比 PI 高出 80%；



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 Probilives Technology CO., LTD.

- **高通量检测**：可支撑大规模样本的凋亡快速检测与定量分析；
- **高效快速**：能高效实现药物作用下细胞凋亡状态的快速评估与毒性效应的快速筛查。

产品参数：

- **YO-PRO™-1 Ex/Em**：491/509 nm；
- **EthD Gold Ex/Em**：532/625 nm（结合 DNA）；
- **Hoechst 33342 Ex/Em**：350/461 nm（结合 DNA）。

产品组分：

组分	10 T	100 T	500 T
A. 1000× Hoechst 33342	1.5 μL	10 μL	50 μL
B. 1000× YO-PRO™-1	1.5 μL	10 μL	50 μL
C. 1000× EthD Gold	1.5 μL	10 μL	50 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。

注意事项：

- 本实验中使用的细胞必须是未固定的细胞，EthD Gold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死细胞。
- 由于流式检测比较灵敏，使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低，此时可根据细胞类型和实际染色情况对 YO-PRO™-1、EthD Gold 的稀释倍数进行适当调整。
- Hoechst 33342 具有潜在致突变性，使用时需采取适当防护措施。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 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（15-25 °C），准备足量PBS缓冲液。
- 工作液制备：本试剂盒提供的三种染料均为 1000×溶液，由于不同细胞种类、细胞浓度的染色条件不同，建议自行摸索 YO-PRO™-1 和 EthD Gold 的最适浓度，染料稀释可用 PBS。

注：YO-PRO™-1 的工作浓度一般为 1-10×，EthD Gold 的工作浓度为 0.2-1×，Hoechst 33342 工作浓度为 1×，所有染料推荐初次使用浓度均为 1×。

注：若配置 10 个 96 孔板：100 μL 的 1×工作液配方如下：在 1000 μL 的 PBS 中加入 1 μL 组分 A (1000× Hoechst 33342)、1 μL 组分 B (1000× YO-PRO™-1)、1 μL 组分 C (1000× EthD Gold)，涡旋震荡混匀制成工作液。

2. 仪器准备：

- 荧光显微镜：激发/发射波长：Ex/Em：491/509 nm、Ex/Em：532/625 nm、Ex/Em：350/461 nm；
- 流式细胞仪：检测通道激发/发射波长：Ex/Em：491/509 nm、Ex/Em：532/625 nm、Ex/Em：350/461 nm。

3. 对照组设置：

组别	YO-PRO™-1	EthD Gold	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：

- 接种培养：将细胞接种于96孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上；

注：悬浮细胞推荐接种量：96 孔板接种约 2×10^3 - 1×10^4 个细胞、24 孔板 5×10^4 - 1×10^5 个细胞、12 孔板约 1×10^5 - 3×10^5 个细胞、6 孔板 5×10^5 - 1×10^6 个细胞。

注：对于贴壁细胞荧光显微镜检测接种量为 24-48 h 后预期汇合度到达 70%-80%，流式细胞仪检测的接种量为 24-48 h 后预期细胞数量约为 5×10^5 - 1×10^6 。

注：不同细胞类型需结合实际实验条件和细胞特性灵活调整。

- 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）

注：以 96 孔板为例

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 μ L PBS 轻柔重悬细胞，进行洗涤。

注：酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。

- (4) 再次 1000 rpm，室温离心 5 min，彻底吸弃上清液。

注：如果有孔板离心机，可直接选择孔板离心机离心并进行后续实验。

2. 细胞染色：

- (1) 每孔/每管加入 100 μ L 染色工作液。

注：通常 96 孔板每孔加入 100 μ L，24 孔板每孔加入 250 μ L，12 孔板每孔加入 500 μ L，6 孔板每孔加入 1 mL。

- (2) 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10-30 min。

注：不同的细胞最佳孵育时间有所不同，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。37 $^{\circ}$ C 避光孵育可实现快速染色。

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) 小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。
- (3) 加入 100 μ L PBS 轻柔重悬细胞，进行洗涤 2-3 次。
- (4) 末次洗涤后，彻底吸净上清液，加入 100 μ L PBS 重悬细胞，制成待测样品。

4. 显微镜观察与拍照：

- (1) 96孔板法：将100 μ L细胞悬液加入96孔板一个孔中，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 μ L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。
 - a. YO-PRO™-1 检测凋亡信号：选用 FITC 通道（Ex/Em: 491/509 nm）或相应滤光片；
 - b. EthD Gold 检测死细胞信号：选用 PI 或 Texas Red 通道（Ex/Em: 550/650 nm）或相应滤光片；
 - c. 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PBS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PBS。

2. 细胞染色：

(1) 向各孔中加入对应体积的染色工作液（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) 37 °C避光孵育10-30 min。

注：不同的细胞最佳孵育时间有所不同，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。37 °C避光孵育可实现快速染色。

3. 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PBS洗涤细胞2-3次，清洗后吸去清洗缓冲液。

4. 显微镜观察与拍照：

(1) 洗涤后，每孔加入对应体积的PBS，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。

a. YO-PRO™-1 检测凋亡信号：选用 FITC 通道 (Ex/Em: 491/509 nm) 或相应滤光片；

b. EthD Gold 检测死细胞信号：选用 PI 或 Texas Red 通道 (Ex/Em: 550/650 nm) 或相应滤光片；

c. 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：收集细胞约为 1×10^6 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。

b. 加入适量的胰酶消化液（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。

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. 将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清。

2. 细胞染色：

(1) 加入500 μL 染色工作液，重悬为单细胞悬液。

(2) 37 °C避光孵育10-30 min。

注：不同的细胞最佳孵育时间有所不同，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。37 °C避光孵育可实现快速染色。

3. 洗涤与重悬：

(1) 孵育结束后，可直接上机检测；也可以离心后清洗一次，加入500 μL PBS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。

a. YO-PRO™-1 检测凋亡信号：选用 FITC 通道 (Ex/Em: 491/509 nm) 或相应滤光片；

b. EthD Gold 检测死细胞信号：选用 PI 或 Texas Red 通道 (Ex/Em: 550/650 nm) 或相应滤光片；

c. 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。



三、结果判读：

1. 定性分析（显微镜）：

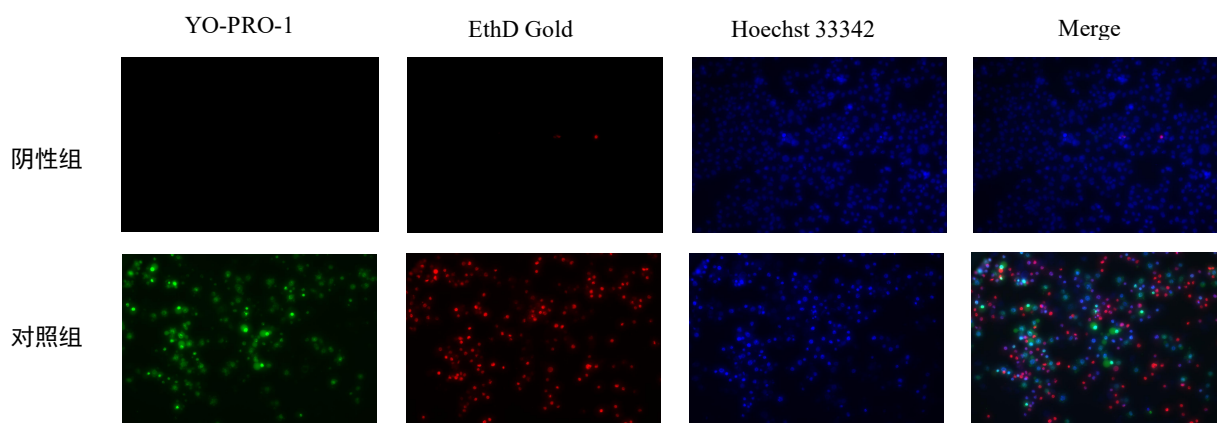


图 1. Chromatin Condensation/Plasma-Membrane Permeability/Dead-Cell Apoptosis Detection Kits 荧光镜检拍照

(1) HEK 293 正常细胞（阴性组）进行 YO-PRO™-1、Hoechst 33342、EthD Gold 同时共染后合成画面 Merge；

(2) HEK 293 凋亡诱导细胞（阳性组）进行 YO-PRO™-1、Hoechst 33342、EthD Gold 同时共染后合成画面 Merge。

结果判读：HEK 293 正常细胞未被 YO-PRO™-1、EthD Gold 染色，Hoechst 33342 可以将全细胞进行染色。HEK 293 经凋亡诱导后，明显出现了凋亡，凋亡细胞被 YO-PRO™-1 染成绿色；死细胞同时被 YO-PRO™-1、EthD Gold 染色，展现出绿色荧光与红色荧光重叠。Hoechst 33342 将全细胞染成蓝色，可方便记录总数，方便分析凋亡细胞和死细胞的占比。

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；以 YO-PRO™-1 为 X 轴，EthD Gold 为 Y 轴，将完整细胞群分为 3 个群体：

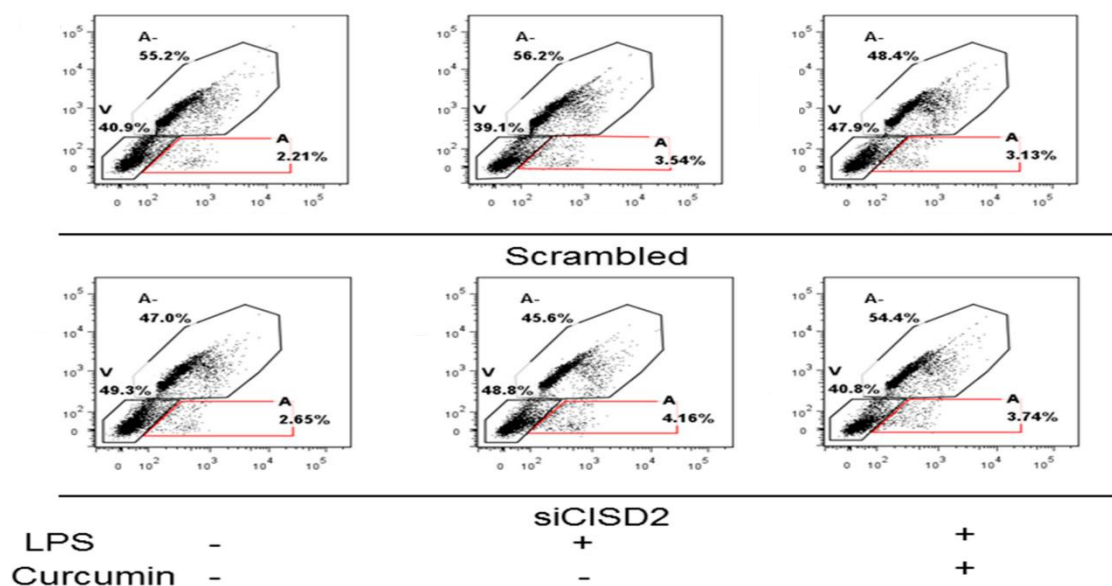


图 2. Chromatin Condensation/Plasma-Membrane Permeability/Dead-Cell Apoptosis Detection Kits 流式细胞术分析

图例：横坐标为 YO-PRO™-1、纵坐标为 EthD Gold；区域 V：活细胞、区域 A：凋亡细胞、区域 A-：死细胞。

注：图片引自《Protective Effects of CISD2 and Influence of Curcumin on CISD2 Expression in Aged Animals and Inflammatory Cell Model》(DOI:10.3390/nu11030700)

结果判读：Human undifferentiated neuroblastoma cell经LPS刺激，在有姜黄素处理、有无CISD2敲低情况下的凋亡情况经流式细胞仪检测分析。与对照组（未用LPS处理）相比，LPS刺激组的细胞凋亡显著增加，与未接受姜黄素处理的LPS刺激细胞相比，接受姜黄素处理的LPS刺激细胞，其凋亡程度明显更低，与转染siCISD2的结果一致。结果表明姜黄素可减少损伤触发的细胞凋亡，从而发挥保护作用。

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。



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：要观察凋亡细胞死细胞和活细胞这三种细胞在同一细胞群中的状态，只能用活细胞。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死细胞的信号。

- 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或死细胞，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，否则检测结果中可能凋亡或死细胞的比例会比较低，对药物效果或者细胞处理效果的评价会产生错误判断；且细胞培养基中含有的血清能够高效的中和胰酶。

- 问：EthD Gold相较PI的核心优势有哪些？

答：EthD Gold 比 PI 用更低剂量、更高亮度、更严膜筛，给出“更真、更亮、更锐”的死细胞群。

a.亮度更高：与 DNA 结合后荧光强度比 EthD-I 再提升 45%，同等曝光下信号更强，拍照或流式检测更敏感。

b.特异性更好：分子量大、膜通透性要求更严格，仅标记膜严重破损的细胞，不标记“轻度膜渗漏”的晚期凋亡，减少假阳性。

c.毒性更低：工作浓度可比 PI 低 3-7 倍即可达到同等或更高荧光，长时间孵育几乎不引起额外细胞死亡，流式死群比例更接近真实。

d.无 RNA 干扰：几乎不与 RNA 结合，无需额外 RNase 处理，DNA 群像更干净，流式直方图 CV 值更小。

e.分群更锐利：双参数图上 EthD Gold 阳性群与阴性群间距大，早期/晚期/死三界界限清晰，便于 gate 设定。

f.兼容固定前检测：虽同样不可固定，但在“活染-上机”流程中信号稳定，固定前拍照/采集不会出现 PI 常见的洗脱-扩散问题。

- 问：DAPI和Hoechst染料非常相似，该如何选用？

答：DAPI是一种非常普通的蓝色核复染荧光染料，能对固定和通透的细胞和组织的细胞核进行非常明亮的标记。普遍认为它是介于半通透性到非通透性之间的染色剂，对活细胞的染色效果也不一致。Hoechst 33342染料是细胞通透性染料，与DAPI染色有相似的染色结合机制和荧光颜色；它是活细胞成像的首选，且对固定细胞的标记效果和DAPI一样好。

- 问：这个染色是孵育 10-30 min 后就必须马上拍照吗？如果不能马上拍照，最多可以放多久呢？具体应该怎么保存？或者有什么短暂的保存办法吗？

答：染完后尽量1-2小时内检测完，可以暂时置于低温冰浴保存。

