

细胞凋亡大讲堂开课了

细胞凋亡（Apoptosis）是细胞程序性死亡的一种形式，伴随典型的细胞形态和生化改变。它并不是一个被动的过程，而是细胞在生理或病理条件下主动启动的、高度有序的自我消亡过程。它由特定基因调控，具有独特的形态学和生化特征，对维持机体稳态、发育和疾病防御至关重要。

细胞凋亡的过程大致分为以下三个阶段：起始阶段→执行阶段→清除阶段。细胞凋亡涉及多种信号通路和调控因子的参与，主要分为三大类：外源性通路（死亡受体通路）、内源性通路（线粒体通路）、内质网通路，各通路间相互作用、互相联系，共同调节凋亡过程。

（1）外源性信号通路（死亡受体通路）

外源性信号通路由细胞外死亡配体触发，依赖膜上死亡受体激活 Caspase 级联反应。死亡受体（DR）属于坏死因子受体（TNFR）基因超家族。目前已知的死亡受体有 TNFR-1、Fas（CD95）、DR3、TRAIL-R1（DR4）和 TRAIL-R2（DR5）等，它们分别被特定的死亡配体如 FasL、TNF- α 和 TRAIL 激活，导致 Caspase-8 和 Caspase-10 的激活。Caspase-8 和 Caspase-10 进一步激活下游的效应器 Caspase-3、Caspase-6 和 Caspase-7，执行细胞凋亡。

（2）内源性信号通路（线粒体通路）

内源性信号通路由细胞内应激信号（如 DNA 损伤、氧化应激等）触发，当细胞凋亡刺激后，线粒体膜通透性改变（MOMP），导致促凋亡因子的释放。在此过程中，Bcl-2 家族蛋白起关键性作用。Bcl-2 家族包括促凋亡蛋白（如 Bax、Bak）和抗凋亡蛋白（如 Bcl-2、Bcl-xL）两大类。两种蛋白通过竞争性结合调控线粒体膜的通透性，进而导致促凋亡因子的释放。这些因子包括细胞色素 C（Cyt c）、SMAC/DIABLO、AIF（凋亡诱导因子）、EndoG 等。它们结合细胞质中的 Apaf-1 和 dATP/ATP 形成 **凋亡体**，激活 caspase-9，进而激活 caspase-3/7，最终引发细胞凋亡。

（3）内质网信号通路

内质网在细胞中负责蛋白的合成、加工和修饰，它也是细胞凋亡的重要调控器。当内质网受到应激刺激时，如钙离子稳态失衡或病毒感染时，会触发未折叠蛋白反应（UPR），导致严重的内质网应激反应（ER stress）。如果应激过强或持续时间过长，就会通过 CHOP/GADD153 基因的激活转录、IRE1-JNK 的激活通路以及 Caspase-4/5/12 的激活以及钙信号紊乱等途径诱导细胞凋亡。

一、形态学观察

1. 光学/荧光显微镜观察

细胞凋亡 (Apoptosis) 在形态学上具有典型特征, 如细胞皱缩、染色质凝聚、核碎裂、凋亡小体形成等。通过光学显微镜 (普通染色) 或荧光显微镜 (荧光染色) 可直接观察这些变化, 是一种直观且经济的凋亡检测方法。如利用台盼蓝染色区分死细胞 (被染色) 和活细胞 (不被染色), 但此方法无法特异性区分凋亡和坏死; 利用 Hoechst 33342/PI 双染色, 标记凋亡细胞的浓缩核或碎片, 碘化丙啶 (PI) 仅进入死细胞 (晚期凋亡或坏死); 利用吉姆萨染色观察凋亡细胞的核固缩、染色质边缘化等形态。

2. 电镜观察 (TEM)

透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscopy, TEM) 是检测细胞凋亡的金标准方法之一, 可在超微结构水平上清晰区分凋亡细胞的典型特征 (如细胞皱缩、染色质凝聚、凋亡小体形成), 提供最直接的形态学证据。

二、生化标志物检测

1. 磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻

磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻法是一种基于细胞凋亡早期膜磷脂不对称性丧失的检测方法。在正常细胞中, PS 主要分布于细胞膜内侧, 而凋亡早期, PS 会外翻至膜外侧, 暴露于细胞表面。利用钙离子依赖性的 Annexin V 蛋白 (通常标记 FITC 等荧光染料) 特异性结合外翻的 PS, 并结合碘化丙啶 (PI) 等膜不透性染料区分膜完整性, 可通过流式细胞术或荧光显微镜进行检测: Annexin V+/PI- 代表早期凋亡细胞, Annexin V+/PI+ 提示晚期凋亡或坏死, Annexin V-/PI- 为活细胞。该方法操作简便、灵敏度高, 广泛用于药物筛选、凋亡机制研究及肿瘤治疗评估, 但需注意避免机械损伤导致的假阳性, 并联合其他方法 (如 Caspase 检测) 以提高准确性。

2. Caspase 活性检测

Caspase 活性检测法是通过测定凋亡关键执行者——Caspase 家族蛋白酶 (尤其是 Caspase-3/7) 的活化程度来检测细胞凋亡的方法。在凋亡过程中, 上游信号 (如线粒体途径或死亡受体途径) 激活 Caspase 级联反应, 导致效应 Caspase-3/7 被剪切活化, 进而切割底物 (如 PARP 或细胞骨架蛋白)。该方法灵敏度高、特异性强, 可区分凋亡与其他死亡

方式，适用于高通量筛选，但需注意某些非凋亡过程（如坏死性凋亡）也可能激活 Caspase，需结合 Annexin V/PI 等其他方法验证。

3. 线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 检测

线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 检测法是通过监测线粒体内膜电位变化来评估细胞凋亡早期事件的方法。在凋亡早期，线粒体膜通透性转换孔 (mPTP) 开放导致线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 下降，这是线粒体途径凋亡的关键标志。该方法灵敏度高，可特异性识别早期凋亡，但需注意缺氧、药物毒性等非凋亡因素也可能影响膜电位，建议联合 Caspase 活性检测或 Annexin V/PI 染色以提高结果可靠性。

三、DNA 断裂检测

1. TUNEL 法 (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) :

TUNEL (Terminal Uridine Nick End Labeling) 是一种通过标记 DNA 断裂的 3'-OH 末端来特异性检测细胞凋亡的技术。由于凋亡过程中内源性核酸酶（如 Caspase-activated DNase, CAD）会切割 DNA，产生大量断裂末端，TUNEL 法可以高效、灵敏地标记这些位点，从而识别凋亡细胞。

2. DNA 片段化分析

琼脂糖凝胶电泳：细胞凋亡时，内源性核酸内切酶（如 CAD）被激活，切割 DNA 在核小体连接处（约 180-200 bp 的倍数），产生规律性的 DNA 片段。通过琼脂糖凝胶电泳，这些片段会形成特征性的“梯状条带” (DNA ladder)，而坏死细胞的 DNA 断裂是随机的，表现为模糊的连续条带 (smear)。

四、流式细胞术

流式细胞术 (Flow Cytometry) 是一种高效、定量的凋亡检测方法，可同时分析大量细胞的凋亡状态及分期（早期/晚期凋亡、坏死）。其核心原理是利用荧光标记的探针（如 Annexin V、PI、Caspase 底物等）结合凋亡特征信号，通过流式细胞仪检测荧光强度，快速区分不同凋亡阶段的细胞群体。

五、其他方法

1. Western Blot 检测凋亡相关蛋白

Western Blot（蛋白质免疫印迹）是一种通过特异性抗体检测凋亡相关蛋白表达或剪切变化的分子生物学技术，适用于定量分析凋亡信号通路关键蛋白（如 Caspases、Bcl-2 家族、PARP 等）。

2.实时细胞分析（RTCA）

实时细胞分析（Real-Time Cell Analysis, RTCA）是一种无标记、动态监测细胞凋亡的技术，通过检测细胞贴附能力和阻抗变化，实时反映凋亡过程中细胞的形态改变和脱落情况。该方法适用于高通量药物筛选和凋亡动力学研究，无需荧光标记或细胞固定，减少人为干扰。

3.高内涵成像分析

高内涵成像分析（High-Content Analysis, HCA）是一种自动化、多参数的细胞凋亡检测技术，通过高通量荧光显微镜成像结合图像分析软件，可同时定量检测凋亡相关的多个标志物（如核形态、Caspase 活化、线粒体膜电位等），适用于大规模药物筛选和凋亡机制研究。

检测方法	检测目标	优势	劣势	适用场景
光学/荧光显微镜观察	形态变化（核固缩、凋亡小体）	- 直观、低成本 - 可区分凋亡阶段（结合 Hoechst/PI）	- 主观性强 - 无法定量	初步筛查、形态学验证
电镜观察（TEM）	超微结构（染色质凝聚、凋亡小体）	- 金标准，分辨率最高 - 明确区分凋亡与坏死	- 耗时（3-7 天） - 设备昂贵、样本制备复杂	机制研究、病理诊断（需超微结构证据）
磷脂酰丝氨酸（PS）外翻	Annexin V 结合膜外翻 PS	- 早期凋亡敏感 - 流式可定量（Annexin V/PI 双染）	- 无法区分凋亡与坏死后期 - 需新鲜样本	流式细胞术定量早期凋亡

检测方法	检测目标	优势	劣势	适用场景
Caspase 活性检测	Caspase-3/7 等酶活性	- 早期凋亡标志 - 荧光底物法高通量	- 仅反映 Caspase 依赖性凋亡 - 可能漏检非经典通路	药物靶点验证、 凋亡通路研究
线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 检测	JC-1/TMRE 标记线粒体膜电位	- 反映线粒体凋亡通路早期事件	- 膜电位变化可能由非凋亡因素引起	线粒体凋亡机制研究
TUNEL 法	DNA 断裂 (3'-OH 末端)	- 高灵敏度 - 适用于组织切片	- 不能区分凋亡与坏死 - 操作复杂 (尤其免疫组化)	原位凋亡检测 (如肿瘤组织)
DNA 片段化分析	DNA ladder (180-200 bp 倍数)	- 特异性强 (凋亡标志) - 低成本	- 灵敏度低 (需 $\geq 10\%$ 凋亡细胞) - 无法定量	凋亡定性验证 (需结合其他方法)
流式细胞术	多参数 (Annexin V/PI、Sub-G1 峰等)	- 高通量、定量精准 - 可同时分析凋亡阶段和细胞周期	- 设备昂贵 - 需单细胞悬液	大规模样本分析、药物筛选
Western Blot	凋亡蛋白 (Cleaved Caspase-3、PARP 等)	- 高特异性 - 可检测多靶点	- 半定量、耗时 - 需大量细胞 ($\geq 10^6$)	分子机制研究 (如通路蛋白表达变化)
实时细胞分析 (RTCA)	细胞阻抗变化 (贴附能力)	- 无标记、动态监测 - 高通量 (96/384 孔板)	- 无法区分凋亡与坏死后期 - 对悬浮细胞不敏感	药物动力学研究、早期毒性筛查

检测方法	检测目标	优势	劣势	适用场景
高内涵成像分析 (HCA)	多参数（核形态、 Caspase 活性等）	- 单细胞分辨率、多 靶点同步分析 - 适合复杂表型（如 异质性群体）	- 设备成本高 - 数据分析复杂	高通量筛选、肿 瘤耐药机制研究

选择建议

- 1.快速筛查：光学显微镜 + Annexin V/PI 双染。
- 2.机制研究：Western Blot（蛋白水平） + 流式/TEM（形态与功能）。
- 3.高通量药物筛选：RTCA（动力学）或高内涵成像（多参数）。
- 4.组织样本：TUNEL 法（原位） + 免疫组化（蛋白定位）。
- 5.早期凋亡检测：Caspase 活性 + 线粒体膜电位。

注意：建议结合至少两种方法（如流式+WB）以提高结果可靠性。

在细胞凋亡研究中，最常用、最通用的检测方法是 Annexin V-FITC/PI 双染法结合流式细胞术，可以覆盖凋亡全过程。目前傲锐赛思根据 Annexin V 双染法创制出四款细胞凋亡检测试剂盒，具体介绍如下，小伙伴们可根据实验需求进行选择。



产品名	Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒	Annexin V-FITC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒	Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒	Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒
Annexin V 荧光 (激发波长Ex、发射波长Em)	FITC (Ex/Em:488/525 nm)	FITC (Ex/Em:488/525 nm)	Alexa Fluor 647 (Ex/Em:650/670 nm)	Alexa Fluor 488 (Ex/Em:488/525 nm)
核酸染料(激发波长Ex、发射波长Em)	PI (Ex/Em: 535/617 nm)	7-AAD (Ex/Em: 546/647 nm)	PI (Ex/Em: 535/617 nm)	PI (Ex/Em: 535/617 nm)
适用范围	基础凋亡检测, 单色或简单多色	多色流式 (避免PE冲突)	多色流式 (需远红通道)	高稳定性绿色荧光检测
优势	成本低, 经典方案	7-AAD发射波谱较PI窄, 光稳定性更好	Alexa 647抗淬灭性强, 适合长时间检测、适用PH范围广 (PH4-10)、亮度高, 适合复杂多色实验	Alexa 488比FITC更亮更稳定、适用PH范围广 (PH4-10)
选择建议	性价比高, 数据易解读, 适合常规短时间凋亡检测	多色流式试验 (含PE标记)、需更高信号稳定性、活细胞长时间检测	多色流式试验 (需远红通道)、具有高亮度需求、固定样本或酸性环境	需高稳定性绿色荧光、多色流式实验 (搭配PE-Cy7或APC标记)、长期成像或固定样本

选购指南

产品货号	产品名称	产品规格	市场价
CB102-20T	Oriscience Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	20T	390
CB102-50T	Oriscience Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	50T	800
CB102-100T	Oriscience Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	100T	1380
CB104-20T	Oriscience Annexin V-Alexa Fluor 488/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	20T	450
CB104-50T	Oriscience Annexin V-Alexa Fluor 488/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	50T	850
CB104-100T	Oriscience Annexin V-Alexa Fluor 488/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	100T	1480



傲锐赛思生物科技（成都）有限公司

	Kit (Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒)		
CB105-20T	Oriscience Annexin V-Alexa Fluor 647/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	20T	450
CB105-50T	Oriscience Annexin V-Alexa Fluor 647/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	50T	850
CB105-100T	Oriscience Annexin V-Alexa Fluor 647/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	100T	1480
CB106-20T	Oriscience Annexin V-FITC/7-AAD Apoptosis Detection Kit (Annexin V-FITC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒)	20T	450
CB106-50T	Oriscience Annexin V-FITC/7-AAD Apoptosis Detection Kit (Annexin V-FITC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒)	50T	850
CB106-100T	Oriscience Annexin V-FITC/7-AAD Apoptosis Detection Kit (Annexin V-FITC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒)	100T	1480

Oriscience Biotechnology Co., Ltd.

www. oriscience. com

Tel: 400-158-2128

Emails: order@oriscience. com

technical_support@oriscience. com

