

流式检测细胞凋亡

一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit	联科生物	AP101
青链霉素	合肥知恩生物	ZNCA-008
胰蛋白酶	合肥知恩生物	ZNCA-009
胎牛血清	合肥知恩生物	ZNCA-007

二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
超净工作台	苏州安泰	SW-CJ-2FD
显微镜	江南永新	XD202
CO2 培养箱	Thermo	3111
台式离心机	Thermo	Pico17
流式细胞仪	BD	BD FACSCalibur

三、实验步骤（参考试剂盒说明书）

背景介绍

Annexin V(或 Annexin A5)为胞内蛋白膜联蛋白家族成员，以钙依赖的方式与磷脂酰丝氨酸(PS)结合。PS 存在于正常细胞浆膜的内层，但在凋亡早期，膜不对称性丧失，PS 易位至细胞表面。荧光标记的 Annexin V 可与之特异性结合，表明该细胞为凋亡细胞。本试剂盒仅需 15 分钟即可染色，快速方便。

仪器参数调节

1. 收集 1×10^6 - 3×10^6 个细胞，用预冷 PBS 离心洗涤两次，弃上清。
2. 加入 500 μ l Apoptosis Positive Control Solution 重悬，置冰上孵育 30 分钟。
3. 用预冷 PBS 离心洗涤，弃上清。
4. 加入适量预冷 $1 \times$ Binding Buffer 重悬，并加入数量相同且未经处理的活细胞与之混合。加入预冷 $1 \times$ Binding Buffer 补充至 1.5 ml，等分成三管，其中一管为空白对照管、两管为单染管。
5. 单染管分别加入 5 μ l AnnexinV-FITC 或 10 μ l PI，室温避光孵育 5 分钟。
6. 在流式细胞仪上，用空白管调节 FSC、SSC 和荧光通道的电压，并在此电压条件下，用单染管调节荧光通道的补偿。

注：某些将贴壁细胞处理为单个细胞的过程中会造成细胞膜损伤，从而造成 AnnexinV 假阳性。因此需要进行优化。可使用对细胞更温和的酶如 Accutase 处理贴壁细胞。

样本检测

1. 按实验方案诱导凋亡。
2. 用预冷 PBS 离心洗涤，收集 $1-10 \times 10^5$ 个细胞(包括培养上清中的细胞)。用双蒸水稀释 $5 \times$ Binding Buffer 为 $1 \times$ 作液，取 500 μ l $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞。

3. 每管加入 5 μ l AnnexinV-FITC 和 10 μ l PI。
4. 轻柔涡旋混匀后，室温避光孵育 5 分钟。
5. 根据实验方法，进行流式分析。
6. 流式分析

在流式细胞仪上，通过 FITC 检测通道检测 AnnexinV-FITC(Ex=488nm;Em=530nm)和通过 PI 检测通道(Ex=535nm; Em=615nm)检测 PI。

结果示例

