

细胞凋亡检测实验 (Annexin V/PI 双染色法)

细胞凋亡检测可以：（1）用于肿瘤细胞和组织在内的不同种类病理标本研究；（2）应用于临床诊疗，新药研制、生物制品开发、肿瘤放化疗、以及从促凋亡角度探索肿瘤的基因治疗；（3）对相关疾病的早期发现、放化疗的疗效评价具有举足轻重的地位。

1、实验方法和原理

细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面，目前早期识别仍有困难。这些细胞膜表面的改变之一是磷脂酰丝氨酸（PS）从细胞膜内转移到细胞膜外，使 PS 暴露在细胞膜外表面。PS 是一种带负电荷的磷脂，正常主要存在于细胞膜的内面，在细胞发生凋亡时细胞膜上的这种磷脂分布的不对称性被破坏而使 PS 暴露在细胞膜外。

Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白，最初发现是一种具有很强的抗凝血特性的血管蛋白，Annexin V 具有易于结合到磷脂类如 PS 的特性。对 PS 有高度的亲和性。因此，该蛋白可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS。

PS 转移到细胞膜外不是凋亡所独特的，也可发生在细胞坏死中。两种细胞死亡方式间的差别是在凋亡的初始阶段细胞膜是完好的，而细胞坏死在其早期阶段细胞膜的完整性就破坏了。因此，可以建立一种用 Annexin V 结合在细胞膜表面作为凋亡的指示并结合一种染料排除试验以检测细胞膜的完整性的检测方法。

2、实验材料、试剂、仪器和耗材

细胞；

HEPES 缓冲液、NaCl、 CaCl_2 、PI、ANNEXIN V-FITC 试剂盒；

流式细胞仪。

3、实验步骤

一、试剂与仪器

1. 孵育缓冲液: 10 mmol/L HEPES/NaOH, pH7.4, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂。
2. 标记液: 将 FITC- Annexin V (宝灵曼公司产品) 和 PI 加入到孵育缓冲液中, 终浓度均为 1 ug/ml。
3. 流式细胞仪。

二、实验步骤

1. 细胞收集: 悬浮细胞直接收集到 10 ml 的离心管中, 每样本细胞数为 $(1\sim5) \times 10^6/\text{mL}$ 500~1 000 r/min 离心 5 min, 弃去培养液。
2. 用孵育缓冲液洗涤 1 次, 500~1 000 r/min 离心 5 min。
3. 用 100 ul 的标记溶液重悬细胞, 室温下避光孵育 10~15 min。
4. 500~1 000 r/min 离心 5 min 沉淀细胞孵育缓冲液洗 1 次。
5. 加入荧光 (SA-FLOUS) 溶液 4℃下孵育 20 min, 避光并不时振动。
6. 流式细胞仪分析: 流式细胞仪激发光波长用 488 nm, 用一波长为 515 nm 的通带滤器检测 FITC 荧光, 另一波长大于 560 nm 的滤器检测 PI。
7. 结果判断: 凋亡细胞对所有用于细胞活性鉴定的染料如 PI 有抗染性, 坏死细胞则不能。细胞膜有损伤的细胞的 DNA 可被 PI 着染产生红色荧光, 而细胞膜保持完好的细胞则不会有红色荧光产生。因此, 在细胞凋亡的早期 PI 不会着染而没有红色荧光信号。正常活细胞与此相似。在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 为 (FITC-/PI-) ; 右上象限是非活细胞, 即坏死细胞, 为 (FITC+/PI+) ; 而右下象限为凋亡细胞, 显现 (FITC+/PI-)。