

细胞凋亡检测实验方法及步骤（流式细胞仪篇）

一、PI 单染色法

1. 收集细胞 { 数目约 $(1 \sim 5) \times 10^6$ 个/mL } , 500 ~ 1000 r/min 离心 5min, 弃去培养液。
2. 3ml PBS 洗涤 1 次。
3. 离心去 PBS, 加入冰预冷的 70% 的乙醇固定, 4℃, 1—2 小时。
4. 离心弃去固定液, 3ml PBS 重悬 5min。
5. 400 目的筛网过滤 1 次, 500—1000r/min 离心 5min, 弃去 PBS。
6. 用 1ml PI 染液染色, 4℃避光 30min。
7. 流式细胞仪检测: PI 用氩离子激发荧光, 激光光波波长为 488nm, 发射光波波长大于 630nm, 产生红色荧光分析 PI 荧光强度的直方图也可分析前散射光对侧散射光的散点图。
8. 结果判断: 在前散射光对侧散射光的散点图或地形图上, 凋亡细胞与正常细胞相比, 前散射光降低, 而侧散射光可高可低, 与细胞的类型有关; 在分析 PI 荧光的直方图时, 先用门技术排除成双或聚集的细胞以及发微弱荧光的细胞碎片, 在 PI 荧光的直方图上, 凋亡细胞在 G1/G0 期前出现一亚二倍体峰。如以 G1/G0 期所在位置的荧光强度为 1.0, 则一个典型的凋亡细胞样本其亚二倍体峰的荧光强度为 0.45, 可用鸡和鲑鱼的红细胞的 PI 荧光强度做参照标准, 两者分别为 0.35 和 0.7, 可以确保在两者之间的不是细胞碎片而是完整的细胞。

注意事项

细胞凋亡时, 其 DNA 可染性降低被认为是凋亡细胞的标志之一, 但这种 DNA 可染性降低也可能是因为 DNA 含量的降低, 或者是因为 DNA 结构的改变使其与染料结合的能力发生改变所致。在分析结果时应该注意。

二、Heochst 33342/PI 双染色法

1. 悬浮生长的细胞在培养的状态下加入 Heochst 33342，终浓度为 1ug/ml；37℃ 孵育 7—10min。
2. 低温 500 ~ 1000r/min 离心 5min 弃去染液。
3. 加入 1.0ml PI 染液，4℃ 避光染色 15min。
4. 400 目的筛网过滤 1 次。
5. 流式细胞仪分析：Heochst 33342 用氩激光激发的紫外线荧光，激发光波波长为 352nm，发射光波波长为 400 ~ 500nm，产生兰色荧光；PI 用氩离子激光激发荧光，激发光波波长为 488nm，发射光波波长大于 630nm，产生红色荧光。分析兰色荧光对红色荧光的散点图或地形图。
6. 结果判断：在兰色荧光对红色荧光的散点图上，结果为：正常细胞为低蓝光/低红光，凋亡细胞为高蓝光/低红光，坏死细胞为低蓝光/高红光。

注意事项

1. 在红色荧光对兰色荧光散点图上，还可见到细胞凋亡区向细胞坏死区迁移的轨迹，可能是凋亡细胞的 DNA 进一步降解的缘故。
2. 用 Heochst 33342 染料与细胞孵育的时间不宜过长，一般控制在 20min 之内为宜。如果太长可引起 Heochst 33342 的发射光谱由蓝光向红光的迁移，导致红色荧光与兰色荧光的比例改变，从而影响结果的判断。

三、Annexin V/PI 双染色法

1. 细胞收集：悬浮细胞直接收集到 10ml 的离心管中，每样本细胞数为 $(1\sim5) \times 10^6$ /mL 500~1000r/min 离心 5min，弃去培养液。

-
2. 用孵育缓冲液洗涤 1 次，500~1000r/min 离心 5min。
 3. 用 100ul 的标记溶液重悬细胞，室温下避光孵育 10~15min。
 4. 500~1000r/min 离心 5min 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 20min，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 488nm，用一波长为 515nm 的通带滤器检测 FITC 荧光，另一波长大于 560nm 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-）。