

凋亡检测操作流程

一、Annexin V 检测凋亡细胞膜的改变

试剂及溶液：

A. 对于单独购买的试剂：

- a) 10X Binding Buffer（货号：556454）：0.1 M HEPES，pH 7.4；1.4 M NaCl；25 mM CaCl_2 。使用前稀释至 1X。
- b) Propidium Iodide（PI，货号：556463）：建议与以下试剂同时使用 Annexin V-FITC（货号：556420，556419）或 Annexin V-Biotin（货号：556418，556417）。
- c) Via-Probe™（货号：555816）：核酸染料 7-AAD。建议与以下试剂同时使用 Annexin V-PE（货号：556422，556421）或 Annexin V-Biotin（货号：556418，556417）。
- d) 1X PBS Buffer（货号：554781）：8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.24 g KH_2PO_4 ，加水至 1L。调整 pH 值至 7.2。高压灭菌室温保存。

B. 对于凋亡检测试剂盒（货号：556547）

- a) FITC Annexin V（组分编号：51-65874X）：每个样本 5 μl 用量。
- b) Propidium Iodide（PI，组分编号：51-66211E）：现成的核酸染料。每个样本 5 μl 用量。
- c) 10X Annexin V Binding Buffer（组分编号：51-66121E）：0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl_2 .使用时用双蒸水配制成 1X。

操作步骤：

1. 取 Falcon 试管，按标本顺序编好阴性对照管和标本管号。
2. 使用冷的 PBS 缓冲液洗细胞两次，再用 1× Binding Buffer 缓冲液制成 1×10^6 细胞/ μl 的悬液。
3. Falcon 试管中加入 100 μl 细胞悬液。
4. 按以下体积加入 Annexin V 与核酸染料：

管号	名称	荧光标记 Annexin V	核酸染料：
1	阴性对照	-	-
2	单阳 1	AV-FITC	-
3	单阳 2	-	PI
4	样本	AV-FITC	PI

5. 轻轻混匀，室温（20°C~25°C）避光处放置 15 分钟。
6. *使用 Annexin V-Biotin 试剂进行检测时：
 - 1×Binding Buffer缓冲液洗细胞一次，去上清。
 - 1×Binding Buffer缓冲液100μl溶解SAV-FITC试剂0.5μg，加入到细胞管中。
 - 轻轻混匀。加入5μl PI，室温（20-25°C）避光处放置15分钟。
7. 各试验管中分别加入 1×Binding Buffer 缓冲液 400μl。1 小时内上流式细胞仪测定结果。

Annexin V Blocking

待测细胞与未标记的重组 Annexin V 预孵育，然后进行实验，是 Annexin V 细胞凋亡检测的质量控制。原理是预先阻断 Annexin V-FITC 的结合位点，这样可以证明 Annexin V-FITC 凋亡分析的特异性。

1. 使用冷的PBS缓冲液洗细胞两次，再用1×Binding Buffer缓冲液制成 1×10^6 细胞/ml的悬液。
2. 在5ml的培养管中加入100μl细胞悬液（约 1×10^5 个细胞）。
3. 加入5-15μg纯化的重组Annexin V。注意，不同的细胞系，以及凋亡的不同阶段，其Annexin V位点饱和所需要的纯化的重组Annexin V含量不同。某些情况下，为达到最好效果，可以减少细胞数量， 0.5×10^5 个细胞加5-15μg纯化的重组Annexin V。
4. 轻轻混匀，室温反应15分钟。
5. 加入5μl的Annexin V-FITC或/和PI，轻轻混匀，室温避光处放置15分钟。
6. 各试验管中分别加入1×Binding Buffer缓冲液400μl。
7. 1小时内上流式细胞仪测定结果。

二、BrdU 检测凋亡细胞 DNA 断裂片段

相关试剂及组分：

APO-DIRECT 试剂盒（货号：556381）：

PartA（4℃ 保存）	PartB（-20℃ 保存）
PI/RNase A Solution	FITC-dUTP
Reaction Buffer	TdT Enzyme
Rinsing Buffer	Negative Control Cells: 已固定细胞
Wash Buffer	Positive Control Cells: 已固定细胞

APO-BRDU™试剂盒（货号：556405）：

PartA（4℃ 保存）	PartB（-20℃ 保存）
FITC-Labeled Anti-BrdU mAb	Br-dUTP
PI/Rnase staining buffer	
Reaction Buffer	TdT Enzyme
Rinsing Buffer	Negative Control Cells: 已固定细胞
Wash Buffer	Positive Control Cells: 已固定细胞

实验操作（适用于APO-DIRECT试剂盒）：

1. 细胞固定：

- 1) 用 PBS 洗细胞后，将细胞重悬于 1%多聚甲醛的 PBS 溶液中，浓度为 $1-2 \times 10^6/\text{ml}$ ，冰浴 30-60 分钟。
- 2) 300×g 离心 5 分钟，弃上清。
- 3) 用 5ml PBS 洗细胞两次，重悬于 70%乙醇中，浓度为 $1-2 \times 10^6/\text{ml}$ ，冰浴 30-60 分钟。（70%乙醇细胞悬液在-20℃ 放置 12-18 小时后进行细胞凋亡检测，得到的效果最好。细胞可以在-20℃ 保存几个月。）

2. 配制染色液，现用现配。

DNA 标记液	1 个测试	5 个测试	10 个测试
Reaction Buffer	10.00μl	50.00μl	100.00μl
TdT Enzyme	0.75μl	3.75μl	7.50μl

FITC-dUTP	8.00μl	40.00μl	80.00μl
蒸馏水	32.2500μl	161.25μl	322.50μl
总体积	51μl	255μl	510.00μl

3. 细胞染色：

- 1) 取离心管和 Falcon 试管，按标本顺序编号。
- 2) 取 1×10^6 细胞悬液加入离心管中， $300 \times g$ 离心 5 分钟，弃去乙醇，留下沉积细胞。

质控细胞（Negative Control Cells、Positive Control Cells）：混匀后取 1ml（细胞数约 1×10^6 /ml）加入离心管中， $300 \times g$ 离心 5 分钟，弃去乙醇，留下沉积细胞。

- 3) 每管各加入 1.0ml Wash Buffer，洗细胞两遍，弃上清。
- 4) 加入 DNA 标记液 50μl 重悬细胞。
- 5) 37°C 温育 60 分钟（或者室温过夜），每 15 分钟摇匀一次。（非质控细胞 37°C 温育时间需根据不同情况有所调整。）
- 6) 每管加入 1.0ml Rinse Buffer， $300 \times g$ 离心 5 分钟，弃上清。重复两遍，弃去上清。
- 7) 加入 0.5ml PI/RNase A Solution，混匀。若细胞浓度低，可将用量调整到 0.3ml。
- 8) 室温避光孵育 30 分钟。
- 9) 3 小时内上流式细胞仪测定结果。

三、JC-1 检测凋亡细胞线粒体膜电位改变

BD™ MitoScreen (JC-1)线粒体膜电位检测试剂盒（551302）：

组分	描述
JC-1(染料)	4 瓶，每瓶用于 25 个样本。冻干粉，使用前稀释至储存液（Stock Solution），使用时稀释至工作液（Working Solution）
10× Assay Buffer	60ml，足以用于 100 个样本。使用前稀释至 1X

试剂准备：

A.10× Assay Buffer 的稀释（Assay Buffer 作为实验的反应液用于清洗细胞）

- 使用前将 10× Assay Buffer 置于 37°C 水浴箱中至溶解。
- 用双蒸水1：10稀释10× Assay Buffer，搅拌5分钟。
- 使用前将1× Assay Buffer 在37°C预热。

B. JC-1的配制

JC-1是以冻干粉形式提供。使用前先配置成储存液，使用时再配置成工作液。JC-1储存液保存于-20°C。JC-1工作液由储存液配置而来，现用现配，多余的工作液不能储存后继续使用。

JC-1储存液的配制（一瓶）：

- 室温下每瓶用125μl DMSO 稀释JC-1冻干粉。反复倒置混匀小瓶使JC-1充分溶解。
- 储存液应立即稀释为工作液或分装成小份（避光操作），-20°C保存（可长达6个月）。
- 避免反复冻融JC-1储存液。

JC-1工作液的配制：

- 37°C预热1× Assay Buffer。
- 用1× Assay Buffer 1：100稀释 JC-1储存液至JC-1工作液。例如将125μl的JC-1储存液加入12.375ml 预热的1× Assay Buffer中。实验操作时，每个样本（<10⁶细胞）需要0.5ml的JC-1工作液。
- 轻柔混匀JC-1工作液待用。（混匀后可能会出现少许JC-1聚集微粒，但并不影响流式检测。也可在室温13,000g 离心3分钟或1,000g 离心15分钟去除JC-1团聚。）

实验操作：

1. 制备 1×10^6 /ml的细胞悬液，浓度不宜过高，因为超过该浓度容易造成细胞的凋亡。
2. 诱导细胞进行凋亡的处理，同时保留一份未经诱导的细胞作为对照。
3. 凋亡处理结束后，每个无菌的15ml聚苯乙烯离心管中加入1ml细胞悬液，室温下， $400 \times g$ ，离心5分钟，弃上清。
4. 每管加入0.5 ml 新鲜配制的JC-1工作液，充分混匀后置于 37°C 的 CO_2 培养箱，孵育10-15分钟。
5. 按以下步骤洗涤细胞两次：

第一次：每管加体积为 2 ml 的 $1 \times \text{Assay Buffer}$ ，轻轻悬浮细胞，振荡或用枪头使细胞分散，以免细胞聚集成块。 $400 \times g$ ，室温离心 5 分钟，弃上清。

第二次：每管加体积为 1ml 的 $1 \times \text{Assay Buffer}$ ，轻轻悬浮细胞，振荡或用枪头使细胞分散，以免细胞聚集成块。 $400 \times g$ ，室温离心 5 分钟，弃上清。

6. 每管加体积为0.5 ml的 $1 \times \text{Assay Buffer}$ ，轻轻悬浮细胞，上机检测。

四、Caspase-3 检测细胞凋亡蛋白酶的活化

相关试剂盒：

产品及组分	货号	包装
PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit	550914	100 次
PE 标记多克隆大鼠抗 活化的 Caspase-3 抗体		
细胞固定/破膜剂（Cytofix/Cytoperm Solution）		
破膜/清洗液（10x）（Perm/Wash Buffer）		
FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit	550480	100 次
FITC 标记多克隆大鼠抗 活化的 Caspase-3 抗体		
细胞固定/破膜剂（Cytofix/Cytoperm Solution）		
破膜/清洗液（10x）（Perm/Wash Buffer）		

实验操作：

1. Camptothecin 诱导细胞凋亡

在 DNA 合成中，需要拓扑异构酶 I。Camptothecin 是拓扑异构酶 I 的抑制剂，它在体外依剂量不同而影响凋亡的发生。在此，Camptothecin 做为常规的凋亡诱导方案，辅助细胞凋亡分析。

凋亡诱导试验用品

- a) 用 DMSO 制备 1.0mM 的 Camptothecin 储备液
- b) Jurkat T 细胞（ATCC TIB-152）

凋亡诱导试验步骤

- a) 1×10^6 cells/ml 增殖的 Jurkat T 细胞加入 Camptothecin，Camptothecin 终浓度为 4-6 μ M。
- b) 细胞 37℃ 孵育 4 小时。

2. Active Caspase-3 染色步骤

- 1) 计算抗体和 Perm/Wash Buffer 缓冲液用量：每个测试样本加入 100 μ l Perm/Wash Buffer 缓冲液和 20 μ l 抗体（见下表）。

测试样本数	细胞总数	Perm/Wash Buffer 体积（ml）	抗体量（ μ l）
1	1×10^6 cells	0.10	20
5	5×10^6 cells	0.50	100
10	10×10^6 cells	1.00	200
20	20×10^6 cells	2.00	400

- 2) 根据用量制备 Perm/Wash Buffer (1×), 将 10×浓度缓冲液使用蒸馏水进行 10 倍稀释, 注意: 有时 10×浓度的缓冲液内会出现沉淀, 属正常现象, 在稀释成 1×浓度的缓冲液后, 使用 0.45μm 的滤器过滤即可。
- 3) 使用冷的 PBS 缓冲液洗细胞两次, 再用 Cytofix/Cytoperm Solution 调整细胞浓度为 1×10^6 cells/0.5ml。
- 4) 细胞冰浴 20 分钟。
- 5) 细胞离心, 弃上清。室温下, 使用 1×Perm/Wash Buffer 洗细胞两次, Perm/Wash Buffer 缓冲液的用量为 0.5ml Buffer/ 1×10^6 cells。
- 6) 按样本数加入 1×Perm/Wash Buffer 和抗体, 混匀, 室温反应 30 分钟。
- 7) 每测试管中, 用 1.0ml 的 1×Perm/Wash Buffer 洗细胞一次, 再用 0.5ml 的 1×Perm/Wash Buffer 制成细胞悬液, 在流式细胞仪上进行样本分析。