

流式细胞术检测细胞凋亡 (Annexin V/PI 法)

Flow Detection of Apoptosis by Annexin V/PI

葛灵, 王雪冬, 丁宇波, 边玮*

细胞分析技术平台, 中科院生物化学与细胞生物学研究所, 上海

*通讯作者邮箱: weibian@sibcb.ac.cn

引用格式: 葛灵, 王雪冬, 丁宇波, 边玮. (2019). 流式细胞术检测细胞凋亡 (Annexin V/PI 法). *Bio-101* e1010331. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010331.

How to cite: Ge, L., Wang, X. D., Ding Y. B. and Bian, W. (2019). Flow detection of apoptosis by Annexin V/PI. *Bio-101* e1010331. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010331. (in Chinese)

摘要: 磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 又称复合神经酸, 位于正常细胞膜的胞质一侧, 在细胞凋亡早期, PS 可从细胞膜胞质侧翻转到细胞膜外表面。基于此现象, 利用 Ca^{2+} 依赖性 Annexin V 可与 PS 特异性结合, 且亲和力高, 适用于细胞凋亡早中期的检测。PI 为一种核酸染色剂, 与细胞核结合将细胞核染为红色。PI 不可透过正常的细胞膜, 可透过凋亡中晚期以及坏死细胞的细胞膜, 适用于在排除细胞坏死的前提下细胞凋亡中晚期检测。将 Annexin V 与 PI 同时使用, 通过分群表征出正常、坏死、凋亡和机械性损伤的细胞。在该实验中, 我们对 HeLa 细胞的对照组和 H_2O_2 诱导组进行 Annexin V/PI 双标记, 经流式细胞仪检测出不同特性的细胞群。

关键词: 细胞凋亡, Annexin V/PI, 流式检测, HeLa 细胞

材料与试剂

1. 5 ml 流式管 (Falcon, catalog number: 352008)
2. 15 ml 离心管 (Falcon, catalog number: 352097)
3. HeLa 细胞
4. Annexin V-Alexa Fluor™488 (Invitrogen, catalog number: A13201)
5. PI 碘化丙啶(Sigma, catalog number: P4170)
6. NaCl
7. Na_2HPO_4
8. KCl
9. KH_2PO_4

10. H₂O₂
11. DEME 培养基
12. HEPES
13. CaCl₂
14. PI 染色工作液 (见溶液配方)
15. 1× Binding buffer (见溶液配方)
16. PBS (见溶液配方)
17. 800 μM H₂O₂ (见溶液配方)

仪器设备

1. 水平转离心机 (BeckmanCoulter, model: Allegra X-12R)
2. 光学显微镜 (Olympus, model: IX73)
3. 流式细胞仪 (FACSFortessa)

实验步骤

1. 染色前处理
 - 1.1 将收集到的细胞, 用预冷 1× PBS (4 °C) 重悬一次, 300 × *g*, 离心 5 分钟, 弃上清, 收集细胞。
 - 1.2 加入 300 μl 的 1× Binding Buffer 重悬细胞, 调整细胞浓度至 1 × 10⁶/ml。
2. Annexin V/PI 染色
 - 2.1 取流式管, 按顺序编好空白管, 单阳管和样本管号。流式管中分别加入经 200 目细胞过滤膜过滤好的 100 μl 细胞悬液, 单阳管中分别加入 5 μl Annexin V-Alexa Fluor™488 或 10μl PI 碘化丙啶轻轻混匀。
 - 2.2 样本管加入 5 μl Annexin V-Alexa Fluor™488 轻轻混匀; 再加入 10 μl PI 碘化丙啶轻轻混匀。
 - 2.3 室温避光孵育 10~20 分钟, 加入 400 μl 1× Binding Buffer, 随后置于冰浴中, 上机检测, 所选通道如下:
Alexa Fluor™488: 488 nm 激发, 采集波段 530/30;
PI: 561 nm 激发, 采集波段 610/20。

结果与分析

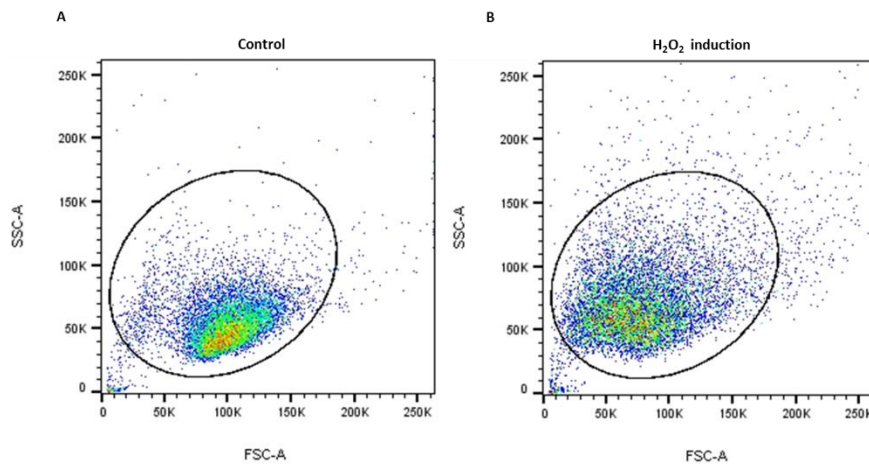


图 1. 前向 (FSC) 和侧向 (SSC) 圈出 HeLa 细胞

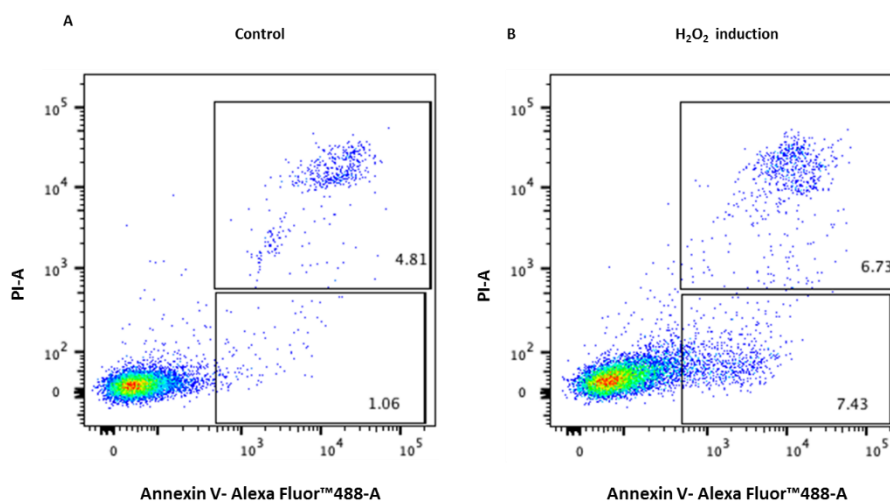


图 2. Annexin V/PI 双标记 HeLa 细胞凋亡检测

如图 1 所示通过前向 (FSC) 和侧向 (SSC), 分别圈出的对照组和 H_2O_2 诱导组的 HeLa 细胞范围有所差别。诱导凋亡组的细胞已呈现出分群的趋势。图 2 为 Annexin V/PI 双标记的结果, 如图 2A 所示对照组的 HeLa 细胞处于正常状态, 但也有少许凋亡晚期的细胞, 原因是培养的 HeLa 细胞浓度过高, 导致培养基里的营养消耗过快, 少许细胞因饥饿发生凋亡。图 2B 中显示, 经 H_2O_2 诱导 HeLa 细胞出现了显著的早期凋亡现象, 比例由 1.06% 增至 7.43%; 凋亡晚期的细胞比例呈明显增长趋势。综上可知, 双标记方法可以准确地反映凋亡过程: Annexin V 标记的单阳性细胞为凋亡早期细胞; Annexin

V 与 PI 双标记的双阳性细胞为凋亡晚期细胞 (Koç,等, 2018); PI 标记的单阳性细胞为坏死细胞; 两者均未标记上的双阴性细胞为活细胞。由此将凋亡早期细胞、凋亡晚期细胞、坏死细胞与正常细胞区别开。因此, 可作为检测细胞凋亡的首选方法 (Schutte 等, 1998)。

注意事项

1. 使用前低速离心, 以免液体积存管盖和管壁。
2. 如果用含 EDTA 的胰酶消化时, 注意必须彻底清除 EDTA: 在标记前用 1× PBS 或 1× Binding buffer 洗涤, 清除 EDTA, 以免残余的 EDTA 与 Ca^{2+} 螯合, 影响 Annexin V 的结合。
3. Annexin V-Alexa Fluor™488 和 PI 是光敏物质, 在操作时请注意避光。在处理和标记时, 尽可能在暗处进行。在孵育阶段, 用铝箔包裹容器或置于抽屉中。细胞标记后, 在暗室内用显微镜观察。
4. 整个操作过程动作要尽量轻柔, 勿用力吹打细胞, 尽量在 4 °C 下操作, 以免影响细胞状态。
5. 在细胞洗涤的最后一步, 请尽量将上清弃净, 以免 PBS 残留, 有可能会影响实验结果。
6. 为防止荧光衰变, 宜在 1 小时内进行流式检测。
7. PI 染色时间过长有可能造成检测的凋亡率偏高, 建议首先进行 Annexin V-Alexa Fluor™488 染色, 最短可在上机前 5 分钟再加入 PI 染色。

溶液配方

1. PBS
NaCl 8 g
Na₂HPO₄ 2.9 g
KCl 0.2 g
KH₂PO₄ 0.2 g
溶于 1L ddH₂O 中, 调 pH 值为 7.2~7.4
过滤灭菌
4 °C 保存

2. 800 μM H_2O_2
取 30% H_2O_2 2 μl 溶于 880 μl 1 \times PBS 中，配成 20 mM 的母液
再取 80 μl 母液溶于 2 ml DEME 培养基
3. PI 染色工作液
1 mg/mL PI 原液+无菌 PBS 按 1:10 稀释成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 工作液
4 $^\circ\text{C}$ 保存待用
4. 1 \times Binding buffer
10 mM HEPES
140 mM NaCl
2.4 mM CaCl_2
pH 7.4

参考文献

1. Koç, E. , Çelik-Uzuner, S., Uzuner, U. and Çakmak, R. (2018). [The Detailed Comparison of Cell Death Detected by Annexin V-PI Counterstain Using Fluorescence Microscope, Flow Cytometry and Automated Cell Counter in Mammalian and Microalgae Cells.](#) *J Fluoresc* 28(6): 1393-1404.
2. Schutte, B., Nuydens, R., Geerts, H. and Ramaekers, F. (1998). [Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells.](#) *J Neurosci Meth* 86(1): 63-69.