

细胞凋亡检测实验报告

一、实验材料

1. 细胞株

子宫平滑肌细胞

2. 主要试剂

PBS 溶液 (0.01M, 自行配制)

0.25%胰酶 (美国 Gibco, 15050057)

Annexin V-APC 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Invitrogen, V35113)

PI 染料 (美国 Invitrogen, R37169)

3. 主要仪器设备

高压灭菌锅 (西安仪创公司, BXM-30R)

超净工作台 (苏净集团安泰公司, SW-CJ-1F)

CO₂ 培养箱 (美国 ThermoFisher, 3131)

倒置相差显微镜 (日本 Olympus, CKX31 型)

离心机 (美国 Eppendorf, 5417R)

流式细胞仪 (美国 BD, FACSVerse)

二、实验方法

1. 细胞收集

(1) 将培养的细胞加入 0.25%胰酶（不含 EDTA），待细胞消化下来，移至离心管中，1000 rpm，离心 5 min 后弃上清液。

(2) 加入预冷 4℃的 PBS 重悬细胞，1000 rpm 离心 5 min，洗涤细胞，弃上清，此步骤重复 2 次。

(3) 离心弃上清后，加入 500 μ l 的 1 \times annexin-binding buffer 重悬细胞。

2. 染色

(1) 细胞悬液中分别加入 25 μ l 的 APC annexin V 和 5 μ l 的 100 μ g/ml PI 染色工作液。

(2) 将细胞置于 37℃中避光孵育 15 min。

(3) 加入 400 μ l 的 1 \times annexin-binding buffer，混匀后放置于冰上，等待上机检测。

3. 上机检测

分别对 Annexin V-APC 荧光选择 APC 通路检测，PI 荧光选择 PerCP/Cy5.5 通路检测，4 组细胞依次上流式细胞仪检测，实验重复 3 次。

4. 结果判定

先根据 SSC/FSC 图选择细胞群，之后对选择的细胞群进行作图。分别将二维散点图的 X 和 Y 轴设为 Annexin V 和 PI，同时将散点图分为 4 个象限（根据未染色的细胞确定），AnnexinV-/PI+区域（左上）的细胞为坏死细胞；AnnexinV+/PI+区域（右上）的细胞为晚期凋亡细胞；AnnexinV+/PI-区域（右下）的细胞为早期凋亡细胞；AnnexinV-/PI-区域（左下）的细胞为活细胞。细胞凋亡率为 AnnexinV+/PI+区域细胞比例加 AnnexinV+/PI-区域的细胞比例。

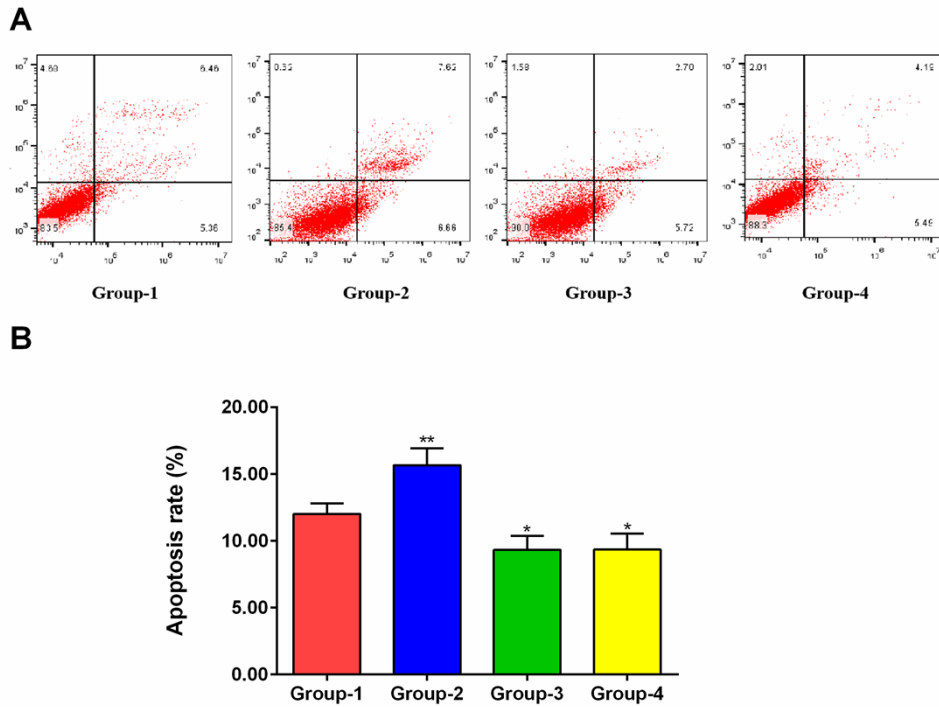
5. 数据处理及统计学方法

实验所得数据采用平均数±标准误 (Mean±SEM) 表示, 所有的数据均使用 GraphPad Prism 6 处理及统计分析。两组样本均值之间的比较采用 *t* 检验, 多组样本均值之间的比较采用 ANOVA 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

东极生物

三、实验结果

流式细胞仪检测结果（图 1）显示，与 Group-1 相比，Group-2 的细胞凋亡比例显著上升（ $P < 0.01$ ）；Group-3、Group-4 的细胞凋亡比例显著下降（ $P < 0.05$ ），两组之间比较并无统计学差异（ $P > 0.05$ ）。



A: 流式细胞凋亡图; B: 细胞凋亡比例统计

图 1 各组子宫平滑肌细胞凋亡情况比较

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Group-1, $n=3$)