

流式细胞凋亡检测实验常见问题解析

转载

科研小行星 于 2021-03-09 00:33:58 发布 2141 收藏

原文链接: <https://www.51xzjyuan.com/53/3445.html>

版权

1、Q: rh Annexin V R-PE 20 tests是BD公司用于凋亡流式检测的试剂盒，产品显示种属为人，请问能否用于大鼠细胞的检测？

A: 可以。因为Annexin V是与PS亲和，而PS在不同种属间应该没差异。在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸（PS）只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，细胞膜中的磷脂酰丝氨酸（PS）由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V是一种分子量为35~36kD的Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白，与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力，故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此Annexin V被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将Annexin V进行荧光素（FITC）标记，以标记了的Annexin V作为荧光探针，利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。

2、Q: 用流式作细胞凋亡为什么跟tunel差别那么大啊？？tunel测出来的细胞凋亡率大概有30%而作流式测出来的凋亡率只有2%（阴性对照0.5%）差别好大啊，用的是beckman公司的Annexin V /PI双染试剂盒，实验步骤如下：

（1）胰酶消化贴壁细胞，加培养基中止，离心1000转5min

（2）吸去上清，PBS0.5ml重悬细胞（因为要送到别处作流式，期间路程约1h，户外温度约37度）

（3）然后加入Annexin V /PI各5微升，避光20min，上机。

请问这是什么原因导致的？

A: 我也用这两种方法做过凋亡，是存在两种方法测的凋亡率差别有点大，但还没有大到你这样的程度。双染测的是凋亡的早期事件PS外翻。TUNEL测的是凋亡最晚期的事件DNA片段化。而且TUNEL在检测过程中，把操作损伤细胞和坏死细胞当作了凋亡细胞，而且如果TUNEL是肉眼计数的话，也会有判断上的误差，所以，往往TUNEL作出来的凋亡率高一点。但如果凋亡率达到30%，ladder估计也应该跑的出来。双染虽然是机器操作，但在调试补偿时，人为的影响还是挺明显的，也不是特别的客观。基线稍微左移，你的凋亡率就成倍上升。所以，给你的建议是在经费、时间允许的范围内再多做几次吧。感觉这么大的差异，可能这两种方法都会存在问题。还有，去流式的路上，装细胞的ep管最好插在冰上，拿着冰盒。

3、Q: 可以用液氮保存瘤组织块，然后再做流式细胞分析吗？

A: 我认为是不可能的。因为流式细胞分析要求细胞分散、单个，活性好，这样才能区分死亡、凋亡和活性细胞。组织在冻存、复温的过程中会有大量的细胞死亡，同时经过这一过程的组织在分离成单个细胞的时候会形成许多细胞碎片，不宜上流式检测了，所以用于流式检测的标本最好是新鲜标本，即取材后立即检测，效果最好。

我以前也试图将组织存入-80℃，然后进行流式检测，结果发现后来处理的组织细胞不是粘团就是破碎，根本无法检测。如果你实在找不到可以检测的流式细胞仪，我建议你可以将组织标本进行切片，然后做原位染色，观察组织细胞的凋亡。

我们实验室的肿瘤组织块一部分冻存于液氮用于以后提蛋白做Western或提RNA做RT-PCR，另一部分用10%的甲醛固定用于以后做免疫组化。

[文章剩余内容<<<<](#)

来源: 51xxziyuan.com