项目结题报告

项目名称：细胞凋亡实验

# 仪器与试剂

## 实验仪器

## 实验试剂

# 实验方法和分组

## 实验方法

实验原理：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。 AnnexinV 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 AnnexinV 进行荧光素(如：EGFP、FITC 等)标记，以标记了的 AnnexinV 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。碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但对凋亡中晚期的细胞和死细胞，PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此将 AnnexinV 与 PI 匹配使用，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来

具体步骤：

1、待各实验组 6 孔板细胞生长至覆盖率约为 70%时药物诱导凋亡（根据客户实验设计确定是否加药诱导）。

2、若为贴壁细胞， 则上清中细胞也需收集。 胰酶消化， 完全培养基重悬成细胞悬液，与上清细胞收集于同一 15 mL 离心管中，每组设三个复孔(为保证上机细胞数足够，细胞数目≥5×105/处理） 。若为悬浮细胞，直接收集。

双染时：

3、在 4℃ 下，1300 rmp 离心 5 min，弃上清，4℃ 预冷的 D-PBS（pH=7.2~7.4）洗涤细胞沉淀。

4、1×binding buffer 洗涤细胞沉淀一次，1300 rmp、5 min 离心，收集细胞。

5、每个样品各加入 85μL 固定 液(Binding Buffer)、10μL 碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)、5μL AnnexinV。室温孵育 15min。

6、根据细胞量，补加 200-400μL 1×binding buffer，在1h内上机检测。

单染时：

3、1300 rmp 离心 5 min，弃上清，4℃预冷的 D-Hanks（pH=7.2~7.4）洗涤细胞沉淀。

4、1 × binding buffer 洗涤细胞沉淀一次，1300 rmp、3 min 离心，收集细胞。

5、200 μL 1 × binding buffer 重悬细胞沉淀。

6、加入 10 μL Annexin V-APC 染色，室温避光 10-15 min。

7、根据细胞量，补加 400-800μL 1 × binding buffer，上机检测。

## 实验分组

# 结果与讨论

## 数据平均值和标准差

## 图表绘制

## 实验结论

## 原始实验数据

《原始实验数据》文件夹内含有流式分选原始结果图。