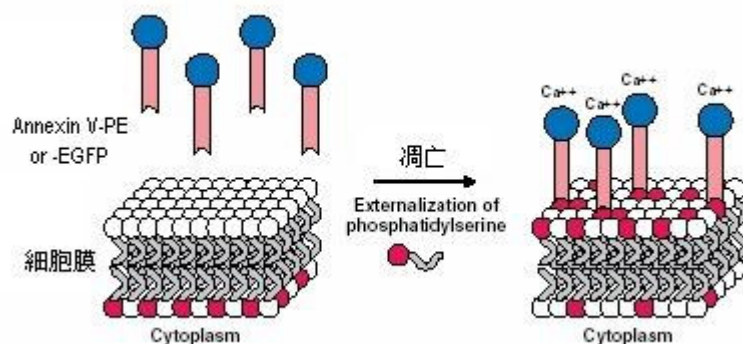


# Annexin V 檢測細胞凋亡

## 1. 基本原理

細胞凋亡早期改變發生在細胞膜表面，這些細胞膜表面的改變之一是 Phosphatidyl Serine (PS) 磷脂從細胞膜內轉移到細胞膜外，使 PS 暴露在細胞膜外表面。PS 是一種帶負電荷的磷脂，正常生理情況它主要存在於細胞膜的內面。在細胞發生凋亡時，細胞膜上的這種磷脂分佈的不對稱性被破壞，而使 PS 暴露在細胞膜外。

Annexin V 是一種  $Ca^{++}$  依賴的磷脂結合蛋白，最初發現是一種具有很強抗凝血特性的血管蛋白。Annexin V 具有易與磷脂類(如 PS)結合的特性，對 PS 有高度的親和性，因此該蛋白可作為一敏感的探針來檢測暴露在細胞膜表面的 PS(如例圖)。然而 PS 轉移到細胞膜外不是凋亡所獨特的，也可發生在壞死細胞上。兩種細胞死亡方式間的差別是在凋亡的初始階段細胞膜是完好的，而細胞壞死在其早期階段細胞膜的完整性就遭到破壞。因此 Annexin V 檢測法多搭配一種 PI 染料排除試驗來達到同時辨識壞死細胞與凋亡細胞的實驗目的。



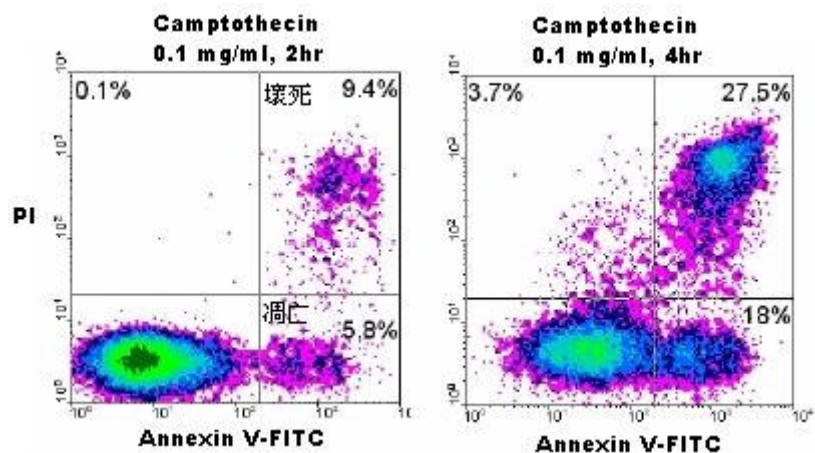
以 Annexin V 檢測早期細胞凋亡之檢測原理

## 2. 試劑與器材

- Annexin V 試劑 (FITC- or PE- 標記)
- 核酸染料 (PI or 7-AAD)
- Annexin V Binding 緩衝液 (Cat. No. 556454)：為 10×濃縮液，使用時，用蒸餾水稀釋成 1×濃度的工作溶液。1× Binding 緩衝液終濃度：10mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140mM NaCl, 5mM  $CaCl_2$ 。
- PBS 緩衝液：含 0.1%  $NaN_3$ ，經 0.22 $\mu$ m 過濾後置 2-8°C 保存。

### 3. 實驗步驟

1. 取 Falcon 試管(Cat.No. 352052)，按順序編好陰性對照管和標本管號。
2. 使用冷的 PBS 緩衝液沖洗細胞兩次(1000rpm，5 分鐘，去上清液)，再用 1× Binding 緩衝液製成  $1 \times 10^6$  cells/ml 的懸浮液。
3. 各取樣 100 ul 細胞懸液於 Falcon 試管。
4. 按廠商建議加入適量體積之 Annexin V 與核酸染料：螢光標記 Annexin V FITC (5 ul)、PI 核酸染料 (10 ul)。
5. 輕輕混勻，室溫下避光靜置作用 15 分鐘。
6. 各試管中分別加入 1×Binding Buffer 緩衝液 400 ul。
7. 使用流式細胞儀測定結果。請注意：務必於一小時內上機完畢。上機前輕搖混勻標本。
8. 結果判讀：早期凋亡細胞對所有用於細胞活性鑑定的染料(如 PI)有拒染性，壞死細胞則不能。細胞膜損傷的細胞，其 DNA 可與 PI 結合而產生紅色螢光；而細胞膜保持完好的細胞則不會有紅色螢光產生。因此，早期的細胞凋亡細胞，並不會與 PI 作用，所以沒有紅色螢光信號；正常活細胞與此相似。在雙參數流式細胞儀的散點圖上 (如例圖)，左下象限顯示活細胞，為 (FITC-/PI-)；右上象限是非活細胞，即壞死期凋亡細胞，為 (FITC+/PI+)；而右下象限為凋亡細胞，顯現 (FITC+/PI-)；左上象限為壞死細胞，為 (FITC-/PI+)。



Annexin V/PI 實驗之結果判讀

#### 4. 注意事項

1. 凋亡細胞形態上的改變影響細胞的光散射特性。在流式細胞儀上，前方散射光與細胞大小有關，而側方散射光反映的是光在細胞內的折射作用，與細胞內的顆粒多少有關。在細胞凋亡時，細胞固縮，體積變小，故前方散射光降低，這一特性往往被認為是凋亡細胞的特點之一。此外，細胞凋亡時由於染色體降解，核破裂形成，細胞內顆粒往往增多，故凋亡細胞之側方散射光信號常增加。細胞壞死時，由於細胞腫脹，其前方散射光增大，側方散射光在細胞壞死時也增大，因此，可根據前方散射光和側方散射光區別凋亡細胞和壞死細胞。研究者可試著看您使用的細胞模式是否真如此？
2. 但需要注意的是，不論受測細胞接受何種藥物處理，由於此實驗是檢測早期細胞凋亡現象，所以檢測細胞多應仍為活細胞，只是細胞膜上的蛋白質呈現細微變化而已。因此經藥物處理過之細胞，在型態上（大小、折射率）應與未經藥物處理之細胞大致相同，呈現於 **FSC vs SSC** 散點圖中之位置應近似重疊，頂多細胞團會稍向外變寬些。
3. 本公司開發了多種標記的 **Annexin V** 產品，簡便快速，30 分鐘就可完成檢測。其中帶螢光標記的 **Annexin V-EGFP** 及 **Annexin V-FITC**，靈敏度高，可作為 **FACS** 細胞分選方法篩選凋亡細胞的基礎。由於 **Annexin V-EGFP** 為重組蛋白，**EGFP** 與 **PS** 的結合比例保證為 1：1，還可用來定量細胞膜上 **PS** 分子數目。

#### 參考文獻：

1. Huschtscha LI, Jeitner TM, Andersson CE, et al. 1994 Identification of apoptotic and necrotic human leukemic cells by flow cytometry. *Exp Cell Res.* 212:161-269.
2. Maartin SJ, Reutelingsporger CP, McGahon AJ, et al. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by over expression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182:1545-1557.
3. Zamai L, Falcieri E, Zaulli G, et al. 1993. Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry.* 14:891-894.