

Annexin V-FITC/PI - оценка апоптоза

Артикулы Servicebio: G1511-50T, G1511-100T

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО / ПОДГОТОВКА И РАБОЧИЕ УСЛОВИЯ

Что подготовить

Подготовьте проточный цитометр либо флуоресцентный микроскоп с подходящими каналами, охлаждённые буферы, пробирки и центрифугу. Для цитометрии заранее запланируйте неокрашенную пробу и два однокрасочных контроля. Отдельно подготовьте клетки без исследуемого воздействия: они показывают исходное состояние культуры, а не только фон флуоресценции.

ОСНОВНЫЕ УСЛОВИЯ ПО ИНСТРУКЦИИ SERVICEBIO

Для какой задачи

Двухцветное исследование клеток методом проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии. Annexin V связывает фосфатидилсерин; PI выявляет клетки с нарушенной мембраной.

Ключевые условия

Соберите $1-5 \times 10^5$ клеток. Для адгезивной культуры сохраните также надосадочную жидкость и используйте трипсин без EDTA. Дважды промойте холодным PBS, каждый раз осаждая при $500 \times g$, 4 °C, 5 мин. Ресуспендируйте в 100 мкл холодного 1× буфера связывания. Добавьте по 5 мкл Annexin V-FITC и PI. После 8-10 мин при комнатной температуре в темноте внесите 400 мкл буфера. Измерьте в течение 1 ч.

Как читать результат

Annexin V–/PI–: живые клетки. Annexin V+/PI–: ранний апоптоз. Двойной положительный сигнал соответствует позднему апоптозу или некрозу и сам по себе их не разделяет.

Контроль качества

Для цитометрии нужны неокрашенный и однокрасочные контроли. EDTA, избыточная трипсинизация и грубое перемешивание искажают результат.

Хранение

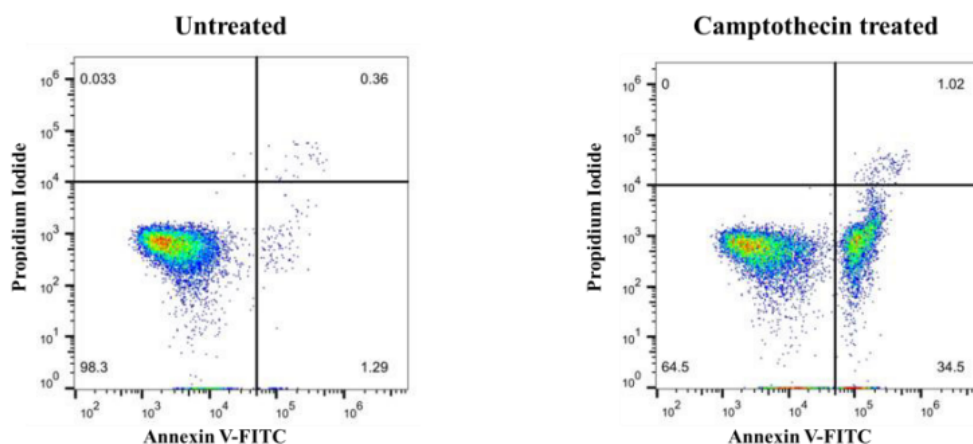
2-8 °C, в темноте; срок - 12 месяцев.

Как спланировать постановку • рекомендации Молекулаб

В журнале обозначьте, какие фракции клеток входят в пробу. Если учитывать только прикрепленные клетки, результат может не отражать всю обработанную популяцию. Предлагаем одинаково организовать сбор и сроки анализа контрольных и опытных групп. Сохраните настройки прибора и последовательность выделения анализируемых клеток, чтобы сравнение можно было воспроизвести.

Результат и контроль качества

Пояснения к методу и практические рекомендации Молекулаб



Servicebio: слева клетки без воздействия, справа - после камптотецина. По горизонтали Annexin V-FITC, по вертикали PI.

Что означает результат

Annexin V распознаёт фосфатидилсерин; его связывание зависит от кальция. Поэтому буфер окрашивания нельзя произвольно заменять раствором с EDTA. PI сообщает о нарушении мембранного барьера. Двойной положительный сигнал не позволяет самостоятельно отличить поздний апоптоз от первичного некроза. Повреждение клеток при подготовке также может менять распределение сигналов.

Какие контроли нужны

Неокрашенные клетки помогают оценить автофлуоресценцию, однокрасочные пробы - настроить компенсацию перекрытия каналов. Контроль без воздействия нужен для сравнения с исходным уровнем повреждения. При анализе сохраняйте одинаковые правила исключения мусора и агрегатов, иначе проценты групп будут рассчитаны относительно разных популяций.

Если результат вызывает вопросы

Высокий PI уже в контроле	Проверьте состояние культуры и бережность отделения и сбора клеток.
Группы плохо разделяются	Проверьте контроли, компенсацию, фон и настройки детектора.
Доля событий резко изменилась	Сверьте состав собранной пробы и правила выделения клеточной популяции.

Что сохранить в лабораторном журнале

В отчёте приводите доли всех четырёх сочетаний сигналов и обозначайте знаменатель расчёта. Если суммируете Annexin V-положительные фракции, поясните, что двойная положительная фракция неоднозначна по механизму гибели.