**流式细胞术检测细胞凋亡技术操作流程（参考）**

* **试剂：**PBS、不含EDTA的0.25％胰酶、培养基、去离子水、细胞凋亡试剂盒（染料含Annexin V 和PI）
* **耗材：**流式管（12×75mm）、300目过滤网
* **操作步骤：**

1. **染色液配置：**根据购买的试剂盒说明书要求配置适当浓度的染色液。
2. **收集细胞：**按细胞培养方法培养细胞至对数生长期，镜检细胞状态良好，收集细胞。

* 悬浮细胞：300 g，4℃ 离心5 min 收集细胞。
* 贴壁细胞：用不含EDTA 的胰酶消化后，300 g，4℃ 离心5 min 收集细胞。胰酶消化时间不宜过长，以防引起假阳性。

1. **洗涤细胞：**

用预冷的PBS 洗涤细胞2 次，300 g，4℃ 离心5 min 收集细胞（1～5×105 cells）。

1. **重悬细胞：**

吸弃PBS，向每个离心管中加入1×Binding Buffer重悬细胞，测定细胞密度，将细胞密度调整至1×106 cells/mL。

1. **染色：**

每100 μL细胞悬液中加入5 µL Annexin V 染色液，轻轻混匀，室温避光孵育细胞15 min。孵育期结束后，再加入5 µL 的PI 染色液避光孵育5 min，最后加入400 µL Binding Buffer，轻轻混匀，置于冰上保存。

1. **过滤：**

用专用滤网过滤各管液体至流式管，尽快（1 h 内）上机检测。

1. **流式仪上机分析：**

在流式细胞仪上使用488 nm 激发光激发，FITC 和PI 通道收集激发光。检测细胞荧光强度，分析不同样本凋亡细胞的比例。

注：A. 典型试验中，群体分为三组：活细胞只显示低水平的荧光，早期凋亡细胞显示绿色荧光，晚期凋亡细胞同时显示红色和绿色荧光。B. 设置空白细胞、Annexin-V 和PI 单染样本，调节至合适的增益值及荧光补偿，并将荧光补偿应用到各样本。

**参考视频网址：（因实验设计、试剂盒及流式仪差异，仅供参考）https://www.bilibili.com/video/BV18Y41147ef?spm\_id\_from=333.337.search-card.all.click**