流式检测细胞周期

一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
青链霉素	合肥知恩生物	ZNCA-008
胰蛋白酶	合肥知恩生物	ZNCA-009
胎牛血清	合肥知恩生物	ZNCA-007
细胞周期检测试剂盒	凯基生物	KGA9101

二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
超净工作台	苏州安泰	SW-CJ-2FD
显微镜	江南永新	XD202
CO2 培养箱	Thermo	3111
台式离心机	Thermo	Pico17
流式细胞仪	贝克曼	CytoFLEX

三、实验步骤（参考试剂盒说明书）

背景介绍

细胞周期（cell cycle）是指连续分裂细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂结束所经历的整个过程。在这个过程中，细胞遗传物质复制并加倍，且在分裂结束时平均分配到两个子细胞中去。细胞周期又可以分为间期（interphase）和有丝分裂期(M phase)，细胞间期又常划分为休眠期（G0），DNA 合成前期（G1），DNA 合成期（S），DNA 合成后期（G2），整个周期可表示为 G1→S→G2→M。DNA 周期检测可用来反应细胞周期的各个期的状况，即细胞增殖状况。利用细胞内 DNA 能够和荧光染料（如碘化丙啶 PI）结合的特性，细胞各个时期其 DNA 含量不同从而结合的荧光染料不同，流式细胞仪检测的荧光强度也不一样。

细胞发生凋亡时，由于胞浆和染色质浓缩、核裂解，产生凋亡小体，使细胞的光散射性质发生变化。在细胞凋亡的早期，细胞对前向角光散射的能力显著降低，对 90°角光散射的能力增加或没有变化。在细胞凋亡的晚期，前向角和 90°角光散射的信号均降低。因此可通过流式细胞仪测定细胞光散射的变化观察凋亡细胞。用 PI 对细胞进行染色，凋亡细胞由于总 DNA 量降低，于正常 G0/G1 细胞群前出现 DNA 低染细胞群，即 G1 峰前出现亚二倍体峰（sub-G1），细胞凋亡群。

检测步骤：

1. 用适当的方法建立检测模型，同时设立阴性对照组，并收集细胞；根据样本数量，计算所需要的染色工作液体积，每样本 500μl 工作液孵育；临用前将 Rnase A:PI 工作液按 1:9 体积配制成染色工作液。

2. 用 PBS 洗涤细胞一次（离心 2000rpm，5min）收集并调整细胞浓度为 1×10^6/ml，取 1ml 单细胞悬液；

3. 制备的单细胞悬液离心后，去除上清，在细胞中加入体积分数为 70%冷乙醇 500ul 固定（2 小时至过夜），4℃保存，染色前用 PBS 洗去固定液；（如需要，细胞悬液用 200 目筛网过滤一次）；离心洗涤条件可参考 1000rpm，3min；
4. 加入提前配制好的 500μL PI/RNase A 染色工作液，室温避光 30-60min；
5. 上机检测，记录激发波长 488nm 处红色荧光。