



平板克隆实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO2 细胞培养箱	Thermo	4131
倒置荧光显微镜	徕卡	DMi8

2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
12 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-12
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
结晶紫	碧云天	C0121-500ml
4% PFA	安徽科兔生物科技有限公司	RG-GD-01



二、实验步骤

- 1、细胞准备：**选择状态良好、处于对数生长期的细胞进行实验。实验前观察细胞形态，确认细胞贴壁良好、无细菌、真菌及支原体污染，且无明显死亡或漂浮细胞。
- 2、细胞消化与计数：**弃去旧培养基，用 PBS 轻轻清洗细胞 1 - 2 次，加入适量胰酶消化细胞。待细胞变圆、脱落后，加入完全培养基终止消化。将细胞悬液轻轻吹打均匀，收集至离心管中，离心后弃上清，用完全培养基重悬细胞，并进行细胞计数。
- 3、细胞接种：**根据细胞增殖速度和实验周期，将细胞按合适密度接种于 6 孔板中。具体接种密度应根据细胞增殖速度进行预实验优化。接种后轻轻摇匀，使细胞均匀分布，避免细胞集中在孔中央或边缘。
- 4、药物或处理因素干预：**根据实验设计进行处理，常见处理方式包括：1) 先处理后接种，细胞经药物、刺激或转染处理后，再进行低密度接种，观察其克隆形成能力。2) 接种后处理：细胞低密度接种并贴壁后，加入药物或处理因素，观察药物对克隆形成的影响。3) 持续处理：整个克隆形成期间持续给予药物或刺激。4) 短期处理后换液培养：药物处理一定时间后换为正常完全培养基，观察细胞恢复增殖和克隆形成能力。具体方式应根据药物作用机制和实验目的确定。
- 5、克隆培养：**将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。培养期间每 2 - 3 天观察一次细胞状态，并根据培养基颜色和细胞状态适当换液。一般培养 7 - 14 天，直至肉眼或显微镜下可见明显细胞克隆形成。对于增殖较慢的细胞，可适当延长至 2 - 3 周。通常认为一个克隆由同一个细胞增殖形成，克隆中细胞数达到 ≥ 50 个细胞时，可作为有效克隆进行统计。
- 6、固定细胞：**当克隆大小适宜后，弃去培养基，用 PBS 轻轻清洗 1 - 2 次。加入 4% 多聚甲醛固定细胞，一般固定 15 - 30 min。固定结束后弃去固定液，用 PBS 轻轻清洗。
- 7、染色：**加入结晶紫染液染色，一般染色 10-30 min。染色完成后，用清水或 PBS 轻轻冲洗，去除多余染液。将培养板倒置晾干，待克隆清晰可见后进行拍照和统计。
- 8、拍照与统计分析：**使用相机、凝胶成像仪或扫描仪拍摄整孔图像。可通过肉眼计数、ImageJ 或其他图像分析软件统计克隆数量和克隆面积。

三、结果判读：

- 1、正常克隆形成结果：**若细胞在培养后形成多个边界清楚、染色明显的细胞团，说明细胞具有一定的长期增殖能力和克隆形成能力。



四、注意事项：

- 1、**接种密度是关键：**接种密度过高会导致克隆相互融合，无法准确计数；接种密度过低则可能导致对照组克隆数过少，统计结果不稳定。建议正式实验前先做预实验，确定合适接种量。原则是最终形成的克隆应彼此分离、大小适中、便于计数。
- 2、**细胞悬液必须混匀：**接种前细胞悬液要充分吹打均匀，避免细胞成团。接种过程中也应间断轻轻混匀细胞悬液，防止细胞沉降导致各孔接种量不一致。
- 3、**接种后摇板方式要规范：**接种后应轻轻前后、左右交叉摇动培养板，使细胞均匀分布。不要剧烈旋转摇晃，否则细胞容易集中到孔边缘，产生边缘效应。