



细胞周期检测实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
离心机	恒诺仪器设备有限公司	2-16R
流式细胞仪	BD	Celesta
1.5mL 离心管	科兔生物	KTL-15-P
流式管	康宁	5ml

2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
PBS	安徽科兔	RG-CE-10
细胞周期检测试剂盒	安徽科兔	CG-ZQ-05

二、细胞周期实验步骤

细胞样品的准备:

(1) 对于贴壁细胞: 小心收集细胞培养液到一离心管内备用。用胰酶消化细胞, 至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时, 加入前面收集的细胞培养液, 吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。1000g 左右离心 3-5 分钟, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞沉淀不充分, 可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清, 可以残留约 50 微升左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约 1 毫升冰浴预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移到 1.5 毫升离心管内。再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 可以残留约 50 微升左右的 PBS, 以避免吸走细胞。轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。

(2) 对于悬浮细胞: 1000g 左右离心 3-5 分钟, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞沉淀不充分, 可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清, 可以残留约 50 微升左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约 1 毫升冰浴预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移到 1.5 毫升离心管内。再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 可以残留约 50 微升左右的 PBS, 以避免吸走细胞。轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。



细胞固定：

(1) 加入 1 mL 冰浴预冷 75~80%乙醇，轻轻吹打混匀，对于易成团的细胞，要一边加入乙醇一边震荡混匀。如果细胞株本身极易成团，可以先将细胞充分重悬在 250 μ L 的 PBS 中，一边逐滴加入 750 μ L 的无水乙醇（预冷）。乙醇终浓度控制在 75%左右即可，PBS 体积及无水乙醇体积可按比例调整。

(2) 将 75~80%的冰乙醇重悬的样品置于-20 $^{\circ}$ C，固定过夜。若着急检测，-20 $^{\circ}$ C 固定 1~2h 也可以进行检测。乙醇固定的样品可以在-20 $^{\circ}$ C 保存 1 个月。1000 \times g 左右离心 3~5min，沉淀细胞。对于特定的细胞，如果细胞沉淀不充分，可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。

(3) 小心吸除上清，可以残留约 50 μ L 左右的 75~80%乙醇，以避免吸走细胞。加入约 1mL 冰浴预冷的 PBS，重悬细胞。再次离心沉淀细胞，尽可能将上清去除干净。

染色：

(1) 每管细胞样品中加入 0.5mL 碘化丙啶染色液，缓慢并充分重悬细胞沉淀，室温避光孵育 15~30min。

(2) 随后可以 4 $^{\circ}$ C 或冰浴避光存放。染色完成后宜在 24h 内完成流式检测，最好能在当日完成流式检测。若细胞容易黏聚，建议染色后用细胞过滤器过滤细胞。

三、流式检测

用流式细胞仪在 535nm 激发波长，615nm 发射波长的通道检测红色荧光，同时检测光散射情况。

四、数据处理

检测完成后可以直接利用流式细胞仪自带软件处理数据,生成 PDF 文件,然后截屏需要的流式细胞图,并对凋亡细胞比例进行统计分析;另外可以保存 FCS 文件,利用 Flowio 等流式数据处理软件对流式细胞图进行处理，如下图所示。

仅供科研用途，不可用于临床诊断！