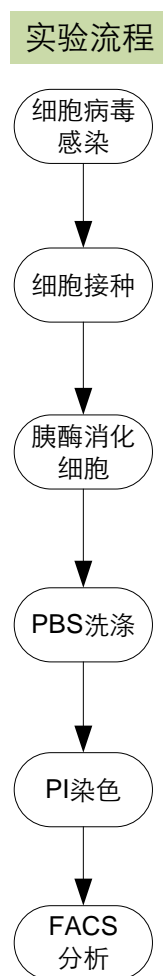

FACS 细胞周期检测

实验方法

实验概述

PI,即碘化丙锭,可以与细胞内 DNA 和 RNA 结合,采用 RNA 酶将 RNA 消化后,通过流式细胞术检测到的与 DNA 结合的 PI 的荧光强度直接反映了细胞内 DNA 含量的多少。由于细胞周期各时相的 DNA 含量不同,通常正常细胞的 G1/ G0 期具有二倍体细胞的 DNA 含量(2N),而 G2/ M 期具有四倍体细胞的 DNA 含量(4N),而 S 期的 DNA 含量介于二倍体和四倍体之间。因此,通过流式细胞术 PI 染色法对细胞内 DNA 含量进行检测时,可以将细胞周期各时相区分为 G1/ G0 期,S 期和 G2/ M 期,并可通过特殊软件计算各时相的百分率。

实验流程



实验设计

根据实验需要设置实验组别，每组 3 个复孔，在特定时间点进行细胞周期检测：

Group phase	1			2		
G0/G1						
G2/M						
S						

实验材料

1. 主要试剂

PI	Sigma P4170
RNase A	10 mg/ml EN0531 Fermentas

2. 主要仪器

流式细胞仪	FACSCalibur, 美国 BD 公司
荧光显微镜	奥林帕斯公司 micropublisher 3.3RTV

实验步骤

1. 待各实验组 6cm dish 细胞生长至覆盖率约为 80%时（确保细胞未进入生长平台期）：吸弃细胞培养上清，D-Hanks 洗涤细胞一次，胰酶消化细胞，完全培养基终止，收集细胞于 5ml 离心管中，每组设三个复孔。（为保证上机细胞数足够，细胞数目 ≥ 1000000 /处理）
2. 1200rpm 离心 5min，弃去上清
3. 4℃ 预冷的 PBS（pH=7.2~7.4）洗涤细胞沉淀 1 次，1500rpm 5min 离心，收集细胞
4. 4℃ 预冷的 70%乙醇固定细胞至少 1h
5. 1500rpm 离心 5min 去固定液，PBS 洗涤细胞沉淀一次，步骤同 3
6. 细胞染色液配制：40xPI 母液（2 mg/ml）：100xRNase 母液（10 mg/ml）：1xPBS =25:10:1000
7. 细胞染色：根据细胞量，加入一定体积的细胞染色液（1~1.5ml）重悬，使上机时细胞通过率为 200~350 Cell/s

8. 300 目的筛网过滤于流式上机管中，上机检测