

细胞周期检测实验报告

一、实验材料

1. 细胞株

人结肠癌细胞（武汉普诺赛，CL-0223）

2. 主要试剂

DMEM/F12 培养基（武汉普诺赛，PM150312）

RPMI-1640 培养基（武汉普诺赛，PM150110P）

FBS（武汉普诺赛，164210-500/100 ml）

青霉素-链霉素溶液（武汉普诺赛，PB180120）

0.25%胰酶（美国 Hyclone，SH30042.01/100 ml）

PBS（南京生兴生物，SN331）

无水乙醇（国药集团，10009218）

PI 染料（美国 Invitrogen，R37169）

RNAase A（美国 ThermoFisher，EN0531）

3. 主要仪器设备

超纯水仪（美国密理博公司，Milli-Q synthesis）

高压灭菌锅（西安仪创公司，BXM-30R）

超净工作台（苏净集团安泰公司，SW-CJ-1F）

水浴锅（姜堰市天力医疗器械厂有限公司，TL-420D）

CO₂ 培养箱（美国 ThermoFisher，3131）

倒置相差显微镜（日本 Olympus，CKX31 型）

离心机（美国 Eppendorf，5417R）

流式细胞仪（美国 BD，FACSVerse）

二、实验方法

1. 细胞收集

(1) 将培养的细胞加入 0.25%胰酶（不含 EDTA），待细胞消化下来，移至离心管中，1000 rpm 离心 5 min，弃上清液。

(2) 加入预冷 4°C 的 PBS 重悬细胞，1000 rpm 离心 5 min 后，洗涤细胞，弃上清，此步骤重复 2 次。

(3) 离心弃上清后，加入少量 PBS 重悬细胞，加入 -20°C 预冷的 75% 乙醇，4°C 固定细胞过夜。

2. 染色

(1) 1000 rpm 离心 5 min 后，弃上清液除去固定液。

(2) 加入预冷 4°C 的 PBS 重悬细胞，1000 rpm 离心 5 min 后，洗涤细胞，弃上清，此步骤重复 2 次。

(3) 加入 500 μ l 的 RNAase (20 μ g/ml)，在 37°C 孵育 30 min。

(4) 1000 rpm 离心 5 min 后，弃上清。

(5) 加入预冷 4°C 的 PBS 重悬细胞，1000 rpm 离心 5 min 后，洗涤细胞，弃上清。

(6) 加入 50 μ g/ml 的 PI 染液，室温下避光染色 30 min，放置于冰上，等待上机检测。

3. 上机检测

对 PI 荧光选择 PerCP/Cy5.5 通路检测，各组细胞依次上流式细胞仪检测，实验重复 3 次。

4. 结果判定

先根据 SSC/FSC 图选择细胞群，之后对选择的细胞群进行作图。分别将 X 和 Y 轴设为 cell number 和 PI（表示细胞 DNA 含量）。流式结果图显示的第一个峰为 G0/G1 期细胞；流式结果图中第二个峰不高但跨度特别大的为 S 期；流式结果图中的第三个峰为 G2/M 期阻滞。

5. 数据处理及统计学方法

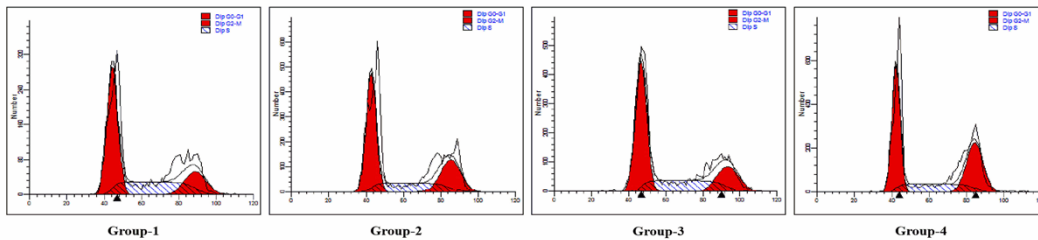
实验所得数据采用平均数±标准误 (Mean±SEM) 表示, 所有的数据均使用 GraphPad Prism 6 处理及统计分析。两组样本均值之间的比较采用 *t* 检验, 多组样本均值之间的比较采用 ANOVA 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

东极生物

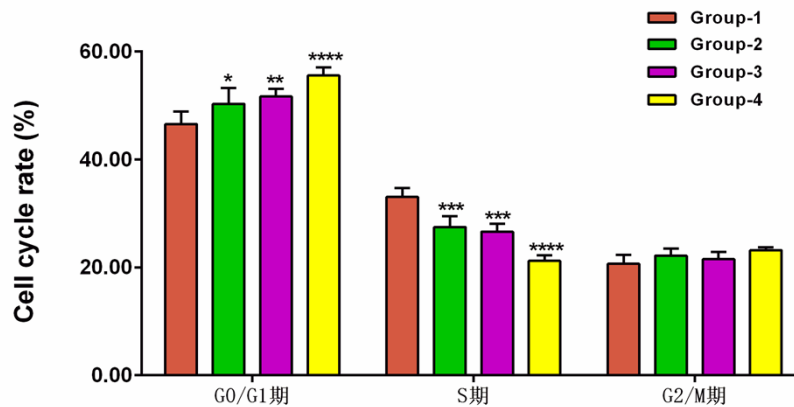
三、实验结果

流式细胞仪检测结果（图1）显示，与 Group-1 相比，Group-2、Group-3 和 Group-4 的 G0/G1 期细胞比例显著升高，S 期细胞比例显著降低，而 G2/M 期细胞比例无统计学差异（ $P>0.05$ ）。

A



B



A: 流式细胞周期图; B: 细胞周期比例统计

图1 各组结肠癌细胞周期情况比较

(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs. Group-1, $n=3$)