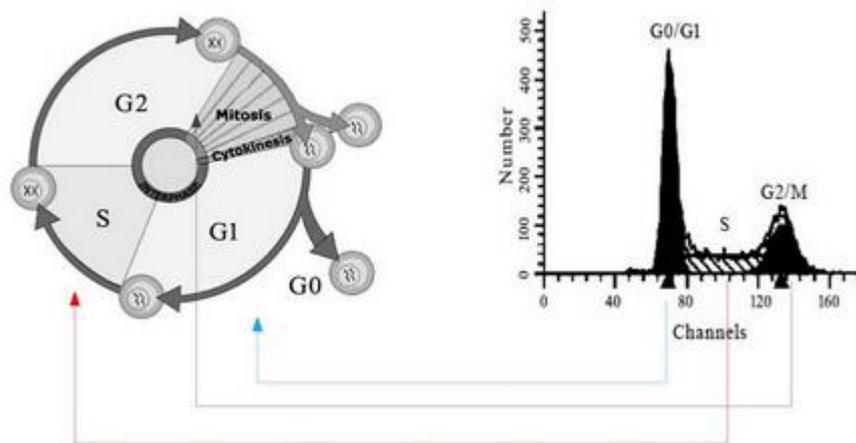


描述: 细胞周期 (cell cycle) 是指连续分裂细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂结束所经历的整个过程。在这个过程中, 细胞遗传物质复制并加倍, 且在分裂结束时平均分配到两个子细胞中去。细胞周期又可以分为间期 (interphase) 和有丝分裂期 (M phase), 细胞间期又常划分为休眠期 (G₀), DNA 合成前期 (G₁), DNA 合成期 (S), DNA 合成后期 (G₂), 整个周期可表示为 G₁→S→G₂→M。DNA 周期检测用来反应细胞周期的各个期的状况, 即细胞增殖状况。利用细胞内 DNA 能够和荧光染料 (如碘化丙啶--PI) 结合的特性, 细胞各个时期其 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 (如下图所示)。PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm, 最大发射波长为 615 nm, PI 的红色荧光在 FL2 或 FL3 通道检测 (通常检测通道为: 488nm 激发; 583nm 检测)。每个样采集 20000~30000events。本试剂盒经过优化的配方, 可获得绝佳的周期结果, 可应用于培养细胞 (悬浮、贴壁) 的 DNA 含量 (细胞周期) 检测。



组分

组分	S0186A(20T)	S0186B(100T)
PI Staining Buffer	10ml	50ml
RnaseA(10mg/ml)	0.1 ml	0.5 ml

注意: (1) 首次使用前将 RnaseA 全部加入到 PI Staining Buffer 中混合均匀 2~8℃可保存 6 个月。

(2) 自备 75%乙醇

储存: 2~8℃, 有效期 2 年。

操作步骤:

1. 细胞周期检测需要细胞量大, 通常使用 6 孔板以上的培养器皿进行检测 (视细胞密度, 约 1×10^6 个 cells)。
贴壁细胞: 从培养板中将培养基吸除, PBS 溶液清洗 3 次, 加入 200 μ l 胰酶消化至单细胞悬液 (可轻轻吹打), 加入 1ml PBS 终止消化, 吹打细胞成单细胞悬液。悬浮细胞: 可直接离心进行后续操作。
2. 2000rpm (300g), 离心 10min, 弃上清 (采用吸取方式, 防止细胞丢失)。
3. 加入 1ml PBS, 轻轻吹打使细胞悬浮, 2000rpm (300g), 离心 10min, 弃上清 (采用吸取方式, 防止细胞丢失)。
4. 加入 500 μ l PBS 重悬细胞, 吹打细胞至单细胞悬液。将细胞逐滴加入到 10ml 冰冷 75%乙醇中 (事先冻存于 -20°C), 漩涡混合仪上迅速混合均匀, 4°C 固定 $>2\text{h}$ (通常过夜), 固定的细胞可于 -20°C 保存 1 个月。
5. 2000rpm (300g), 离心 10min, 完全弃上清 (采用吸取方式, 防止细胞丢失), 用 200 μ l 吸头尽可能多的吸除残留乙醇。
6. 直接使用 0.5ml PI Staining Buffer (确认已经加入 RnaseA) 重悬细胞, 使用 PI Staining Buffer 调整细胞浓度至 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml。
7. 室温避光孵育 15~20min 后进行检测 (细胞孵育时间不要超过 1h)。
9. 使用 FL2 通道检测, 收集 20000~30000 events。FL2 使用 Lin 参数收集信号, FL2-W/FL2-A, 进行圈门排除粘连体细胞。试验结束后, 使用 Flowjo 或 ModFit 软件进行拟和数据分析。

通常使用该试剂盒可以获得绝佳的结果 (CV 极小)。下图为使用 Gavua 流式细胞仪获得的周期检测结果。

