

# 利用流式细胞仪分析细胞存活率、细胞周期、ROS

(以 6 孔板为例)

## 测定细胞存活率

1. 取对数生长期的细胞, 以  $4 \times 10^5$ /ml 密度接种于 6 孔细胞培养板上;
  2. 培养过夜后, 用于相应实验处理;
  3. 收集处理后的细胞培养液至流式专用管;
  4. 加 1ml PBS 缓冲液清洗一次, 清洗液加入管中;
  5. 胰酶消化收集细胞于上述管中;
  6. 1ml PBS 缓冲液清洗剩余细胞一次, 清洗液加入离心管;
- 注: 3—6步都收集于同一流式专用管。
7. 800 g 离心 6 min, 去上清;
  8. 加 1 ml PBS 缓冲液重悬细胞, 再次离心弃上清;
  9. 最后重悬细胞于 500  $\mu$ l 含 5  $\mu$ g/ml 碘化丙啶(propidium iodide, PI)的 PBS 缓冲液中;
  10. 避光冰上孵育 10 min, 用流式细胞仪测定细胞存活率;
  11. PI 可结合 DNA, 在一定波长的激发光作用下可发出荧光, 其强度与 DNA 含量成正比, 但其不能透过完整的细胞膜。而 FS (前向散射) 则是指示细胞大小的参数。因此, 我们以 FS 为横坐标, PI 的荧光值的对数 ( $\log$  PI) 为纵坐标, 就可将不同大小和不同荧光强度的细胞区分开: 活细胞表现出较大的 FS 值和较弱的荧光强度; 坏死的细胞碎片, 由于丢失部分 DNA, 具有较小的 FS 值和较弱的荧光性; 凋亡细胞的细胞膜具有通透性, 细胞虽然聚缩变小, 但核保持完整, 所以显示出较小的 FS 值和较强的荧光强度。通过计算活细胞占有所有细胞的百分率, 即可得知细胞存活率。

## 测定细胞周期

1. 细胞的处理及收集同测定细胞存活率方法的第 1-8 步;
2. 用 300  $\mu$ l 的 PBS 重悬细胞, 将细胞逐滴加入 700  $\mu$ l 预冷的无水乙醇中, 乙醇终浓度为 70%, 4 $^{\circ}$ C 避光固定过夜;
3. 800 g 离心 10 min, 去上清;

4. PBS 清洗两次;
5. 重悬细胞于 500  $\mu$ l 含 100 unit/ml RNaseA 的 PBS 缓冲液中, 避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;
6. 加 2 mg/ml PI 至终浓度 50  $\mu$ g/ml, 避光孵育 30 min,
7. 以 PI 荧光读数为横坐标, 细胞数为纵坐标, 在流式细胞仪上计数细胞周期各期的细胞数目。

### 测定胞内ROS的积聚

1. 细胞的处理及收集同测定细胞存活率方法的第 1-8 步;
2. 重悬细胞于 1ml 的 PBS 缓冲液中;
3. 加荧光探针如 CM-H2 DCFDA (主要检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , 1  $\mu$ mol/ml), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;
4. 在流式细胞仪上以 FS 和 SS (侧向散射, 指示细胞光透射程度) 为参数, 选取活细胞 (大 FS 值, 较小 SS 值), 将其限定在 Gate 内, 对 Gate 内的细胞进行 ROS 的分析。以相应荧光探针荧光读数的对数为横坐标, 细胞数为纵坐标即可测定活细胞的 ROS 的相对强度。