**实验报告**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目名称：** | 细胞凋亡检测（流式） |

|  |  |
| --- | --- |
| **委托方（甲方）：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **受托方（乙方）：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **日期：** | 年 月 日 |

# 1 实验信息

见实验方案

# 2 仪器、试剂及实验细胞系

## 2.1 主要仪器

**表1** 实验所用主要仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **型号** | **生产商** |
| 二氧化碳培养箱 | 3111 | Thermo |
| 全自动细胞计数仪 | Countess II | Thermo |
| 荧光倒置显微镜 | Ts2R-FL | NIKON |
| 成像系统 | DP73 | OLYMPUS |
| 低速离心机 | TD5 | 卢湘仪 |
| 真空吸液泵 | G6-802B | 其林贝尔 |
| A2 型二级生物安全柜 | 1800A2 | 上海知楚 |
| 流式细胞仪 | ACEA NovoCyte | 安捷伦 |

## 2.2 主要试剂

**表2** 实验所用主要试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **货号** | **生产商** |
| MEM（含NEAA） | PM-150410 | 普诺赛 |
| 0.25％Trypsin Solution | SH30042.01 | HyClone |
| Penicillin-Streptomycin Solution | SV30010 | HyClone |
| 二甲基亚砜（DMSO） | D8371 | Solarbio |
| 胎牛血清（FBS） | 10091148 | Gibco |
| 细胞凋亡（Annexin V-FITC-PI）检测试剂盒 | PBCA004 | 普析生物 |

# 3 实验细胞系

L929小鼠成纤维细胞: MEM（含NEAA）＋10% FBS＋1% P/S

# 3 实验方法

# 3.1细胞复苏

3.1.1从液氮中取出细胞冻存管 (注意：佩戴防爆管面具) ，快速将其置入 37℃水浴中解冻， 直至冻存管中无结晶，然后用 75%的酒精擦拭冻存管外壁；

3.1.2将冻存管中的细胞移至含 5mL 完全培养基的 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min；

3.1.3弃上清，沉淀用 5mL 完全培养基重悬，接种 T25 培养瓶，于 37℃,5%CO2 细胞培养箱中培养；

3.1.4第二天，换用新鲜完全培养基继续培养。

## 3.2细胞传代

3.2.1细胞生长至覆盖培养瓶的 80%面积时，弃 T25 培养瓶中的培养液，用 PBS 清洗细胞一次：

3.2.2添加 0.25%胰蛋白酶消化液约 1mL 至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5mL 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min；

3.2.3弃上清，沉淀细胞用 1-2mL 完全培养基重悬，然后按 1:2 比例进行分瓶传代 (两个 T25)， 补充新的完全培养基至 5-8mL/瓶，最后放入 37℃,5%CO2 细胞培养箱中培养；

## 3.3 细胞冻存

3.3.1细胞生长至覆盖培养瓶的80%面积时，弃 T25 培养瓶中的培养液，用 PBS 清洗细胞一次；

3.3.2添加 0.25%胰蛋白酶消化液约 1mL 至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5mL 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min；

3.3.3弃上清，沉淀细胞加入 1mL/支的无血清冻存液，混匀后加入冻存管中。 (如：冻一支，加入 1mL 无血清冻存液)

3.3.4将冻存细胞直接放入－80℃冰箱即可；如后期要将细胞转入液氮罐中，需在-80℃冰箱存放 24 小时以上。

## **3.4** 细胞凋亡检测（一步法）

3.4.1 按实验方案处理细胞结束后，小心收集细胞培养液到一离心管内备用，PBS洗涤贴壁细胞一次。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。备注：对于悬浮细胞，按实验方案处理细胞结束后，收集细胞悬液至离心管中。

3.4.2 300g离心5min，弃上清。用PBS洗涤细胞一次，离心弃上清，轻轻重悬细胞并计数。

3.4.3 取1-5\*105重悬的细胞，300g离心5min，弃上清。用PBS洗涤细胞一次，离心弃上清，加入500µL 稀释的1x Annexin V Binding Buffer轻轻重悬细胞。

3.4.4 细胞悬液中加入5µL Annexin V-FITC Reagent和5µL PI Reagent，轻轻涡旋混匀。

3.4.5室温避光孵育15-20min。

3.4.6 立即上机检测。如不能及时检测，请于冰上避光静置并于1h内完成检测。

注：染色结束后上机检测流式细胞仪检测时Annexin- V-FITC可用FITC通道，PI优先选择PerCP/Cy5.5通道，其次是ECD通道。

注：具体操作步骤见附件说明书。

3.4.7 结果解读



Annexin-V 阴性-PI 阴性（左下象限）：代表活细胞的比例。

Annexin-V 阳性-PI 阴性（右下象限）：代表凋亡早期的细胞比例。

Annexin-V 阳性-PI 阳性（右上象限）：代表凋亡晚期的细胞比例。

Annexin-V 阴性-PI 阳性（左上象限）：代表坏死的细胞和细胞碎片比例。