**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、试剂与实验细胞系

## 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 | NoVoCyte 2060R | Agilent Technologies |

## 2.2 主要试剂

**表2** 实验所用主要试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **货号** | **生产商** |
| DMEM培养基 | CM10013  | 中科迈晨 |
| DMEM/F12培养基 | CM10092 | 中科迈晨 |
| 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 |
| Annexin V-FITC/7-AAD 荧光双染细胞凋亡检测试剂盒 | P-CA-202 | 普诺赛 |

# 2.3实验细胞系

Hela (人宫颈癌细胞)：完全培养基:DMEM+10%FBS+1%PS

# AC16 (人心肌细胞): 完全培养基:DMEM/F12＋10% FBS＋1% P/S

# 3 实验方法

# 3.1细胞复苏（原代细胞和干细胞不适用）

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（原代细胞和干细胞不适用）

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 h以上。

## 3.4 细胞凋亡检测

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离心管内备用，PBS洗涤贴壁细胞2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，收集细胞到15mL离心管中，PBS洗涤细胞一次，加入细胞培养液并轻轻吹散细胞。

3.4.2 1000g离心3-5min后，用PBS轻轻重悬细胞并计数。

3.4.3 取5-10万重悬的细胞，1000g离心5min，弃上清，加入200µL Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。

3.4.4 加入5µL Annexin V-FITC，轻轻混匀。

3.4.5 加入5µL 7-AAD染色液，轻轻混匀。

3.4.6 室温(20-25ºC)避光孵育15min，为避免细胞凋亡进程，可置于冰上操作。孵育过程中可以重悬细胞2-3次以改善染色效果。可以使用铝箔进行避光。

3.4.7 染色结束后上机检测。

3.4.8 结果解读：



Annexin-V 阴性-7-AAD阴性（Q2-3）：代表活细胞的比例。

Annexin-V 阳性-7-AAD阴性（Q2-4）：代表凋亡早期的细胞比例。

Annexin-V 阳性-7-AAD阳性（Q2-2）：代表凋亡晚期的细胞比例。

Annexin-V 阴性-7-AAD阳性（Q2-1）：代表坏死的细胞和细胞碎片比例。