**实验报告**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目名称：** | 细胞爬片 EDU 染色实验检测报告 |

|  |  |
| --- | --- |
| **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

详见实验方案

# 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 |
| 病理切片扫描仪 | Pannoramic SCAN II | 3DHISTECH |

## 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 |
| 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 |
| Opti-MEM | 244496 | Gibco |
| Lipofectamine™ 3000 | 2343152 | Thermo Fisher |
| 通透液(Triton X-100) | P0096 | 碧云天生物技术 |
| DAPI染液 | C02-04002 | 北京博奥森生物技术有限公司 |
| 抗荧光淬灭封片剂 | S2100 | 北京索莱宝科技有限公司 |
| BeyoClick™ EdU-594细胞增殖检测试剂盒 | C0078S | Beyotime |

## 2.3 实验细胞系

CAL 27 (人舌鳞癌细胞) 生长培养基：DMEM＋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 小时以上。

## 3.4 细胞爬片 EDU 染色检测

3.4.1 取对数生长期细胞，以每孔1\*105细胞接种24孔板爬片。

3.4.2 过夜培养后，按照实验方案加入相应的处理。

3.4.3 处理结束后，配制2X的EdU工作液。由于EdU工作液是与培养液等体积加入到孔板中，所以需要配制成2X的工作液。推荐的EdU终浓度为10μM (1X)，用细胞培养液1:500稀释EdU (10mM)即可得到2X的EdU工作液(20μM)。

3.4.4 将37ºC预热的2X的EdU工作液(20μM)，等体积加入24孔板中，使24孔板中的EdU终浓度变为1X。如果培养基体积过大，可以先吸除适量的培养液，再加入等体积的2X的EdU工作液；或者可以减少工作液的体积并增加EdU的浓度，使最终培养液中的EdU浓度为10μM，例如2ml培养液中加入220微升0.1mM EdU。更换所有的培养液可能会对细胞的增殖有影响，因此不建议替换所有的培养液。

3.4.5 继续孵育细胞2h。该孵育时间的长短取决于细胞生长速率，通常宜继续孵育细胞周期10%左右的时间。对于常见的哺乳动物细胞如HeLa、3T3、HEK293等，细胞周期大约在18-25h，孵育时间宜在2h左右。人胚胎细胞的细胞周期约30min，推荐的孵育时间为5min；酵母细胞的细胞周期约3h，推荐的孵育时间为20min，增殖的神经细胞其细胞周期约5天，推荐的孵育时间为1天。孵育时间小于45min时，建议提高EdU的浓度；孵育时间大于20h时，建议适当降低EdU的浓度。

3.4.6 EdU标记细胞完成后，去除培养液，并加入1ml固定液(4%的多聚甲醛)，室温固定15min。

3.4.7 去除固定液，每孔用1mL洗涤液洗涤细胞3次，每次3-5min。

3.4.8 去除洗涤液，每孔用1mL通透液(含0.3% TritonX-100的PBS)，室温孵育10-15min。

3.4.9 去除通透液，每孔用1mL洗涤液洗涤细胞1-2次，每次3-5min。

3.4.10 配制Click Additive Solution：1.3mL去离子水溶解一管Click Additive，混匀至全部溶解，即为ClickAdditive Solution。配制后可以适当分装，并-20ºC保存。

3.4.11 参考下表配制Click反应液。注意：请严格按照下表中组分顺序和体积配制Click反应液，否则点击反应可能无法有效进行；同时，Click反应液须在配制后15min内使用。



3.4.12 去除上一步骤中的洗涤液，每孔加入0.5mL Click反应液，轻轻摇晃培养板以确保反应混合物可以均匀覆盖样品。

3.4.13 室温避光孵育30min。

3.4.14 吸除Click反应液，用洗涤液洗涤3次，每次5min。

3.4.15 细胞核染色。1X Hoechst 33342溶液的配制：按1:1000比例用PBS稀释Hoechst 33342 (1000X)。吸除洗涤液后，每孔加1X Hoechst 33342溶液1mL，室温避光孵育10min。

3.4.16 吸除1X Hoechst 33342溶液，用洗涤液洗涤3次，每次5min。

3.4.17 封片：取出爬片用 PBS（PH7.4）洗涤 3 次，每次 5min。爬片稍甩干后将有细胞的一面朝下用抗荧光淬灭封片剂将玻片封固在载玻片上封片。

3.4.18 采集图像: Hoechst 33342为蓝色荧光，最大激发波长为346nm，最大发射波长为460nm。Azide 594为红色荧光，最大激发波长是590nm，最大发射波长是615nm。

## 3.5 实验结果

实验结果见附件。