**实验报告**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目名称：** | 细胞ROS检测（红色荧光） |

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

见项目方案

## 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 |
| 多功能酶标仪 | SpectraMax M5 | Molecular Devices |

## 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 |
| 活性氧（ROS）测定试剂盒说明书（红色荧光） | PBCA010 | 普析生物 |

# 2.3实验细胞系

Hela (人宫颈癌细胞)：完全培养基:DMEM+10%FBS+1%PS

# 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ROS检测 （流式细胞仪、荧光显微镜观察、荧光酶标仪检测适用于贴壁细胞和悬浮细胞）

3.4.1各试剂平衡至室温（完全融化），试剂一和试剂二使用前 300×g 离心 2min ，试剂一（探针）可分装后-20℃避光保存，避免反复冻融，试剂失效。

3.4.2 试剂一工作液的配制：试剂一（探针）使用无血清培养基稀释到所需浓度得到试剂一工作液，推荐的浓度为 10μmol/L，可根据实验效果进行调整。现配现用，避光备用，2h 内使用有效；试剂二使用（可选做）：试剂二（阳性对照）可以按 1:1000 的比例使用。例如装载好探针的细胞共 1mL，可以加入 1µL的阳性对照刺激(通常刺激后 20-30 分钟内可以观察到非常显著的活性氧水平升高) 。对于不同细胞。活性氧对照的效果可能有较大的差异。如果在刺激后 30 分钟内观察不到活性氧的升高，可以适当提高活性氧阳性对照的浓度，反之如果活性氧升高过快则可以适当降低它的浓度。活性氧阳性对照仅仅用于作为阳性对照的样品，并不是在每个样品中都需加入活性氧阳性对照。

3.4.3 根据实验设计进行细胞培养，将 2×10^5 个细胞接种至板孔中，培养过夜确保细胞健康且不会过度生长。悬浮细胞：将细胞转移至 2 mL EP 管中，300×g 离心 5 min 后除去培养基，用无血清培养基（或者 PBS）洗涤细胞 3 次。贴壁细胞：除去培养基，用无血清培养基（或者 PBS）洗涤细胞 3 次。

3.4.4设置空白组(只有正常细胞)，对照组(只有正常细胞，并装载探针)，阳性对照组(细胞装载探针，并经试剂二工作液处理)和实验组(细胞装载探针，并经药物处理)。

3.4.5空白组用无血清培养基，对照组、阳性对照组和实验组装载探针，根据细胞培养容器配置适当的的试剂一工作液体积。通常每 2×10^5 个细胞加入 500μL 试剂一工作液，推荐试剂一工作液的浓度 10μmol/L。37oC，避光孵育细胞 30-60min。(此过程孵育时间长短与细胞类型、荧光探针浓度有关，各组加入液体体积保持一致)

3.4.6 用无血清培养基（或者 PBS）洗涤细胞 2-3 次，以充分去除未进入细胞内的荧光探针。空白组、对照组加入无血清培养基。阳性对照组进行阳性刺激。实验组进行药物处理过程：实验组根据自身实验需求选择药物处理的条件。(此过程孵育时间长短与细胞类型、阳性刺激和药物浓度有关，各组加入液体体积保持一致。)

3.4.7 用无血清培养基（或者 PBS）洗涤细胞 2-3 次，以充分去除阳性刺激组多余的阳性刺激和实验组多余的药物。每管悬浮细胞需要再次加 200μL 无血清培养基重悬细胞，转移至检测载体中并用于检测。贴壁细胞可以直接装载载玻片进行检测。

注：实验过程也可以先进行药物处理和阳性刺激，再装载探针。

3.4.8 流式细胞仪上机检测：可以用PE的参数设置检测，用FlowJo软件分析细胞 ROS 水平。

3.4.9 结果解读：当细胞受到刺激时，ROS的平均荧光强度（Mean值）会升高，流式的原始数据为FCS格式，用FlowJo软件可以打开，客户只需要看分析文件夹的分析结果即可。即看下图红框内是Mean值。

示意图如下：

空白组 处理组

  

3.4.10荧光显微镜拍照：用激光共聚焦显微镜/荧光显微镜（参数设置Cy3 Filter ，TexasRed 或 RFP）直接观察、并拍照记录。

3.4.11 结果解读：当细胞受到刺激时，ROS的水平会升高，细胞发出绿色荧光；绿色荧光的强度会随着ROS水平的升高而增强。如果需要读取平均荧光强度，可以采用ImagePro Plus6软件读取。

3.4.12荧光酶标仪上机检测：荧光酶标仪Excitation: 300 nm 或488 nm ；Emission: 610 nm进行检测。

3.4.13 结果解读：当细胞受到刺激时，ROS荧光值会升高。

注：具体操作步骤详见附件说明书。