**实验报告**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目名称：** | 细胞脂质过氧化检测（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、试剂及主要细胞系

## 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** |
| RPMI-1640培养基 | CM10040 | 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 |
| 脂质过氧化检测试剂盒(BODIPY 581\_591 C11) | S0043 | Beyotime |

# 2.3实验细胞系

HTR-8-Svneo (人绒毛膜滋养层细胞)：RPMI-1640+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 细胞脂质过氧化检测

3.4.1. BODIPY 581/591 C11染色工作液的配制

 6孔板每孔所需BODIPY 581/591 C11染色工作液的量为1mL，其它培养器皿的BODIPY 581/591 C11染色工作液的用量以此类推；对于细胞悬液每50-100万细胞需0.5mL BODIPY 581/591 C11染色工作液。取适量BODIPY 581/591 C11 (2mM)，按照每 1µL BODIPY 581/591 C11 (2mM)加入1mL PBS (C0221A)的比例稀释BODIPY 581/591 C11，混匀后即为BODIPY 581/591 C11 染色工作液(2μM)。 注1：配制BODIPY 581/591 C11染色工作液时注意避光，且须现配现用，不宜保存后使用。 注2：BODIPY 581/591 C11染色工作液中BODIPY 581/591 C11的最终浓度需根据不同细胞系和实验体系通过预实验进行优化。 BODIPY 581/591 C11的推荐工作浓度为2μM，可以在2-10μM范围内摸索最佳工作浓度。

3.4.2 染色

1）对于悬浮细胞：

a. 细胞按照实验设计进行一定处理后，计数。取适当细胞600×g室温离心5分钟，弃上清，加入适当体积的BODIPY 581/591 C11染色工作液重悬细胞，使细胞密度为100万-1000万/mL。

b. 细胞培养箱中37ºC孵育10-30分钟，不同的细胞最佳孵育时间不同。以20分钟作为初始孵育时间，根据作用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

c. 37ºC孵育结束后，600×g 4ºC离心3-4分钟，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。

d. 用PBS洗涤2次：加入1mL PBS重悬细胞，600×g 4ºC离心3-4分钟，沉淀细胞，弃上清。再加入1mL PBS重悬细胞，600×g

4ºC离心3-4分钟，沉淀细胞，弃上清。

e. 再用适量PBS重悬细胞后，用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察，也可以用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

2）对于贴壁细胞：

注：对于贴壁细胞，如果希望采用流式细胞仪检测，可以先消化并收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

a. 对于6孔板的一个孔，吸除培养液，根据具体实验如有必要可以用PBS或其它适当溶液洗涤细胞一次。如果使用其它的多孔板，各种试剂的用量需要相应按比例调整。

b. 加入1mL BODIPY 581/591 C11染色工作液。细胞培养箱中37ºC孵育10-30分钟，不同的细胞最佳孵育时间不同。以10分钟作为初始孵育时间，根据作用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

c. 37ºC孵育结束后，吸除上清，用PBS洗涤2次。

d. 加入2mL PBS，荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。如果考虑使用荧光酶标仪检测，优先推荐使用碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP965)，分别进行顶读或底读模式进行荧光检测。