

常用细胞周期流式检测方法

Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry

涂溢晖, 王雪冬, 丁宇波, 边玮*

细胞分析技术平台, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海

*通讯作者邮箱: weibian@sibcb.ac.cn

引用格式: 涂溢晖, 王雪冬, 丁宇波, 边玮. (2019). 常用细胞周期流式检测方法. *Bio-101* e1010328. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010328.

How to cite: Tu, Y. H., Wang, X. D., Ding, Y. B. and Bian, W. (2019). Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010328. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010328. (in Chinese)

摘要: 细胞周期 (cell cycle) 是指细胞从上一次分裂完成到下一次分裂结束所经历的全部过程, 包括分裂间期和分裂期 (M 期), 其中分裂间期又可分为 DNA 合成前期 (G1 期)、DNA 合成期 (S 期)、DNA 合成后期 (G2 期)。G0 期是静止期细胞, 它们暂时脱离细胞周期, 停止细胞分裂, 但在一定条件的刺激下, 又可重新进入细胞周期进行分裂 (Cooper, 2000)。细胞是生命活动的基本单位, 而细胞周期又与细胞的增殖和分化密切相关。因此, 对于细胞周期的检测至关重要。细胞内的 DNA 含量会随细胞周期进程而发生周期性变化, 通过流式细胞仪对细胞内 DNA 的相对含量进行测定, 可分析细胞周期各阶段的百分比。常用于测定 DNA 含量的染料有碘化丙啶 (PI)、4,6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI)、7-氨基放线菌素 (7-AAD)、Hoechst 33342、Hoechst 33258 等。本文主要就其中两种常用染料 PI (固定细胞染色) 和 Hoechst 33342 (活细胞染色) 的实验方法、注意事项和结果分析展开介绍。

关键词: 细胞周期, 流式细胞术, 碘化丙啶, Hoechst

材料与试剂

1. 15 ml 离心管 (Falcon, catalog number: 352097)
2. 5 ml 流式管 (Falcon, catalog number: 352008)
3. 200 目细胞过滤膜
4. Hoechst33342 (Sigma-Aldrich, catalog number: B2261)
5. NaCl

6. Na_2HPO_4
7. KCl
8. KH_2PO_4
9. 70%乙醇
10. 碘化丙啶 (PI) (Sigma-Aldrich, catalog number: P4170)
11. 核糖核酸酶 (Roche, catalog number: 11119915001)
12. 磷酸缓冲液 (1× PBS) (见溶液配方)
13. 碘化丙啶 (PI) 溶液 (见溶液配方)
14. 核糖核酸酶 (RNase) 溶液 (见溶液配方)
15. Hoechst 33342 溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 涡旋混合器 (其林贝尔, model: VORTEX-6)
2. 水平离心机 (Beckman Coulter, model: Allegra X-12R)
3. 光学显微镜 (Olympus, model: IX73)
4. 流式细胞仪 (BD FACSFortessa)

实验步骤

1. 固定细胞 PI 染色法 (Davies 和 Allen, 2007)
 - 1.1. 收集 2×10^5 细胞, $200 \times g$ 离心 2 分钟, 去除上清, 并用 1 ml 1× PBS (不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 清洗一次。
 - 1.2. 用 0.5 ml 预冷的 70%乙醇重悬固定细胞, 在涡旋器上一滴一滴地加入乙醇, 4°C 固定 30 分钟以上。在醇类固定剂中 -20°C 下可以存放几个星期。
 - 1.3. $200 \times g$ 离心 2 分钟, 去除乙醇, 并用 1 ml 1× PBS 清洗三次。
 - 1.4. 用含 $50 \mu\text{g/ml}$ PI 和 $200 \mu\text{g/ml}$ RNase 的 0.5 ml 1× PBS 重悬细胞, 37°C 孵育 30 分钟。
 - 1.5. 无需洗涤, 样品过 200 目细胞过滤膜后转移至流式管。
 - 1.6. 上机检测, 用 561 nm 的激光激发 PI, 收集 610/20 nm 波段的发射光, 低速上样, 总共记录 20,000 个目的细胞。

2. 活细胞 Hoechst 33342 染色法

2.1. 收集 2×10^5 细胞, $200 \times g$ 离心 2 分钟, 去除上清, 用 1 ml $1 \times$ PBS (不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 清洗一次。

2.2. 用含 $10 \mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 的 PBS 重悬细胞, 37°C 孵育 30 分钟。

注: Hoechst 最佳浓度和染色时间需要根据具体的每种细胞来确定, 一般浓度在 $5\sim 20 \mu\text{g/ml}$, 孵育时间为 $30\sim 120$ 分钟。

2.3. 无需洗涤, 样品过 200 目细胞过滤膜后转移至流式管, 放置冰上。

2.4. 上机检测, 用 355 nm 的激光激发 Hoechst 33342, 收集 $450/50 \text{ nm}$ 波段的发射光, 低速上样, 总共记录 20,000 个目的细胞。

注意事项

1. 一定要做细胞计数, 确保细胞数与固定剂量和染料的浓度相匹配。一般来说细胞浓度控制在 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 细胞/毫升。
2. 贴壁细胞的消化时间要控制好, 消化时间过长, 细胞易成团。可边消化边观察。
3. 如果细胞标记荧光蛋白或需要做表面标记, 不能使用醇类固定剂, 可以使用醛类固定剂。使用醛类固定剂时可以加 0.1% Triton X-100。
4. 醇类固定后的样品可以在 -20°C 存放几个星期, 若短时间可置于 4°C 避光保存。
5. 上样速度不宜过快, 细胞浓度不宜过高, 一般低流速、200 个细胞/秒为佳。

结果与分析

细胞周期的分析, 以 HeLa 细胞为例, 图 1 为固定细胞 PI 染色法, 图 2 为活细胞 Hoechst 33342 染色法。首先用前向 (FSC) 和侧向 (SSC) 圈出细胞群, 再用荧光通道的 W (宽度)/A (面积) 去除粘连细胞, 最后用荧光通道的柱状图分析细胞周期。图中所标 a、b 和 c 分别代表 G0/G1 期细胞、S 期细胞和 G2/M 期细胞。

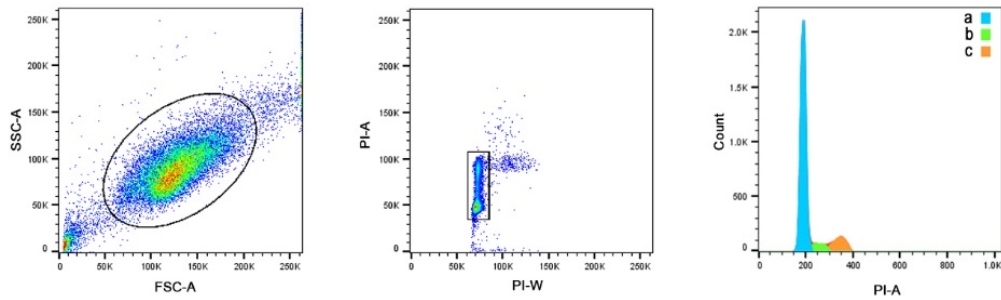


图 1. 固定细胞 PI 染色法检测细胞周期

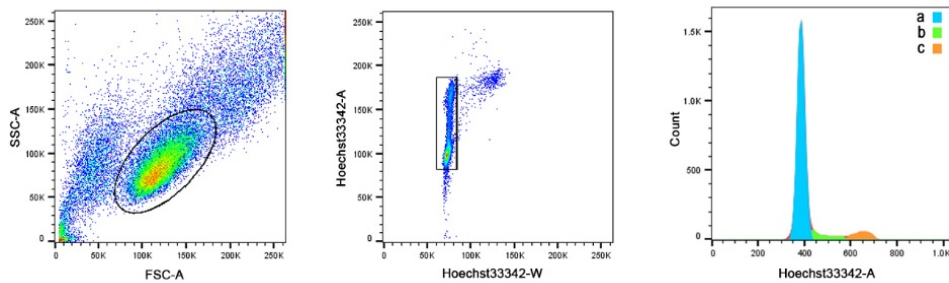


图 2. 活细胞 Hoechst33342 染色法检测细胞周期

失败经验

染料浓度过高或过低或染色时间不够，都可能导致 DNA 的四倍体峰无法显示。

溶液配方

1. 磷酸缓冲液 (1× PBS)
 - NaCl 8 g
 - Na₂HPO₄ 2.9 g
 - KCl 0.2 g
 - KH₂PO₄ 0.2 g
 溶于 1 L ddH₂O 中
 调整 pH 值为 7.2~7.4，过滤灭菌，4 °C 保存
2. 碘化丙啶 (PI) 溶液
 - 2.5 mg PI 溶于 1 ml ddH₂O 中，4 °C 保存
3. 核糖核酸酶 (RNase) 溶液

0.5 mg 核糖核酸酶溶于 0.5 ml 10 mM 的 Tris-HCl (pH 7.5) 中
100 °C 加热 15 分钟
缓缓冷却至室温后分装成小份保存于-20 °C

4. Hoechst 33342 溶液

10 mg Hoechst 33342 溶于 1 ml ddH₂O 中, 4 °C 保存

致谢

感谢中科院生物化学与细胞生物学研究所细胞分析技术平台的全体成员的建议和帮助。

参考文献

1. Cooper, G. M. (2000). Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle. In: [*The cell: a molecular approach*](#). 2nd edition. Washington, D.C: ASM Press. ISBN: 978-0-87893-106-4.
2. Davies, D. and Allen, P. (2007). [Chapter 7: DNA Analysis by Flow Cytometry](#). In: *Flow Cytometry. Principles and Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press. ISBN: 978-1-58829-691-7.