

细胞周期测定实验

细胞计数法：

实验方法原理 体外培养细胞 生长、分裂繁殖的能力，可用分裂指数来表示。它与生长曲线有一定的联系，如随着分裂指数的不断提高，细胞也就进入了指数生长期。

分裂指数指细胞 群体中分裂细胞 所占的百分比，它是测定细胞 周期的一个重要指标，也是不同实验研究选择细胞的重要依据。

实验材料 细胞

试剂、试剂盒 胰酶 甲醇 培养液 冰醋酸 Giemsa 染液

仪器、耗材 CO2 培养箱 普通显微镜 培养皿 盖玻片 吸管

实验步骤 一、消化细胞，将细胞 悬液接至内含盖玻片的培养皿中。

二、CO2 培养箱中培养 48 小时，使细胞长在盖片上。

三、取出盖片，按下列顺序操作：

PBS 漂洗 3 分钟→甲醇：冰醋酸=3：1 固定液中固定 30 分钟→Giemsa 液染色 10 分钟→自来水冲洗。

四、盖片晾干后反扣在载玻片上，镜检。

五、计算

分裂指数=分裂细胞 数/总细胞 数×100%

展开

注意事项 1. 操作时动作要轻，以免使盖片上的细胞脱落。

其他 一、Giemsa 染液配制

称 Giemsa 粉末 0.5 g，加几滴甘油研磨，再加入甘油（使加入的甘油总量为 33 ml）。56℃ 中保温 90-120 分钟。加入 33 ml 甲醇，置棕色瓶中保存，此为 Giemsa 原液。使用时按

要求用 PBS 稀释。一般稀释 10 倍。

BrdU 参入法

实验方法原理 细胞周期指细胞一个世代所经历的时间。从一次细胞分裂结束到下一次分裂结束为一个周期。细胞周期反应了细胞增殖速度。

单个细胞的周期测定可采用缩时摄影的方法，但它不能代表细胞群体的周期，故现多采用其他方法测群体周期。

BrdU (5-溴脱氧尿嘧啶核苷) 加入培养基后，可做为细胞 DNA 复制的原料，经过两个细胞周期后，细胞中两条单链均含 BrdU 的 DNA 将占 1/2，反映在染色体上应表现为一条单体浅染。如经历了三个周期，则染色体中约一半为两条单体均浅染，另一半为一深一浅。细胞如果仅经历了一个周期，则两条单体均深染。计分裂相中各期比例，就可算出细胞周期的值。

实验材料 细胞

试剂、试剂盒 BrdU 甲醇 冰醋酸 Giemsa 染液 秋水仙素 SSC 柠檬酸三钠 NaCl

仪器、耗材 冰箱 玻片 水浴锅 锅盖 紫外灯 光学显微镜

实验步骤 一、试剂配制

1. BrdU 配制

BrdU 10 mg 加双蒸水 10 ml，4℃下避光保存。

2. 2×SSC 配制

NaCl 1.75 g，柠檬酸三钠 0.88 g，加水至 100 ml，4℃保存。

二、细胞生长至指数期时，向培养液中加入 BrdU，使最终浓度为 10 μg/ml。

三、44 小时加秋水仙素，使每 ml 中含 0.1 μg。

四、48 小时后常规消化细胞至离心管中，注意培养上清的漂浮细胞也要收集到离心管中。

五、常规染色体制片。

六、染色体玻片置 56°C 水浴锅盖上，铺上 2×SSC 液，距紫外灯管 6 cm 处紫外照射 30 分钟。

七、弃去 2×SSC 液，流水冲洗。

八、Giemsa 液染色 10 分钟，流水冲洗，晾干。

九、镜检 100 个分裂相，计第一、二、三、四细胞期分裂指数。

十、计算

细胞周期 (Tc) = $48 / \{ (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4) / 100 \}$ (小时)

展开

其他 一、细胞周期介绍

细胞周期 (cell cycle) 是指细胞从前一次分裂结束起到下一次分裂结束为止的活动过程，分为间期与分裂期两个阶段。

1. 间期

间期又分为三期、即 DNA 合成前期 (G1 期)、DNA 合成期 (S 期) 与 DNA 合成后期 (G2 期)。

(1) G1 期

此期长短因细胞而异。体内大部分细胞在完成上一次分裂后，分化并执行各自功能，此 G1 期的早期阶段特称 G0 期。在 G1 期的晚期阶段，细胞开始为下一次分裂合成 DNA 所需的前体物质、能量和酶类等。

(2) S 期

S 期是细胞周期的关键时刻，DNA 经过复制而含量增加一倍，使体细胞成为 4 倍体，每条染色质丝都转变为由着丝点相连接的两条染色质丝。与此同时，还合成组蛋白，进行中心粒

复制。S 期一般需几个小时。

(3) G₂ 期

为分裂期做最后准备。中心粒已复制完毕，形成两个中心体，还合成 RNA 和微管蛋白等。

G₂ 期比较恒定，需用 1 ~ 1.5 小时。

2. 分裂期

细胞的有丝分裂 (mitosis) 需经前、中、后、末期，是一个连续变化过程，由一个母细胞分裂成为两个子细胞。一般需 1 ~ 2 小时。

(1) 前期 (prophase) 染色质丝高度螺旋化，逐渐形成染色体 (chromosome)。染色体短而粗，强嗜碱性。两个中心体向相反方向移动，在细胞中形成两极；而后以中心粒随体为起始点开始合成微管，形成纺锤体。随着核仁相随染色质的螺旋化，核仁逐渐消失。核被膜开始瓦解为离散的囊泡状内质网。

(2) 中期 (metaphase) 细胞变为球形，核仁与核被膜已完全消失。染色体均移到细胞的赤道平面，从纺锤体两极发出的微管附着于每一个染色体的着丝点上。从中期细胞可分离得到完整的染色体群，共 46 个，其中 44 个为常染色体，2 个为性染色体。男性的染色体组型为 46, XY，女性为 46, XX。分离的染色体呈短粗棒状或发夹状，均由两个染色单体借狭窄的着丝点连接构成。

(3) 后期 (anaphase) 由于纺锤体微管的活动，着丝点纵裂，每一染色体的两个染色单体分开，并向相反方向移动，接近各自的中心体，染色单体遂分为两组。与此同时，细胞波拉长，并由于赤道部细胞膜下方环行微丝束的活动，该部缩窄，细胞遂呈哑铃形。

(4) 末期 (telophase) 染色单体逐渐解螺旋，重新出现染色质丝与核仁；内质网囊泡组合为核被膜；细胞赤道部缩窄加深，最后完全分裂为两个 2 倍体的子细胞。

在体内根据细胞的分裂能力可把它们分为三类：

①增殖细胞群，如造血干细胞，表皮与胃肠粘膜上皮的干细胞。这类细胞始终保持活跃的分裂能力，连续进入细胞周期循环。

②不再增殖细胞群，如成熟的红细胞、神经细胞、心肌细胞等高度分化的细胞，它们丧失了分裂能力，又称终末细胞（end cell）。

③暂不增殖细胞群，如肝细胞、肾小管上皮细胞、甲状腺滤泡上皮细胞。它们是分化的，并执行特定功能的细胞，在通常情况下处于 G0 期，故又称 G0 期细胞。在某种刺激下，这些细胞重新进入细胞周期。如肝部分切除术后，剩余的肝细胞迅速分裂。

流式细胞仪

实验方法原理 流式细胞仪的工作原理是将待测细胞放入样品管中，在气体的压力下进入充满鞘液的流动室。在鞘液的约束下细胞排成单列由流动室的喷嘴喷出，形成细胞柱。通过对流动液体中排列成单列的细胞进行逐个检测，得到该细胞的光散射和荧光指标，分析出其体积、内部结构、DNA、RNA、蛋白质、抗原等物理及化学特征。

细胞内的 DNA 含量随细胞周期进程发生周期性变化，如 G0/G1 期的 DNA 含量为 2C，而 G2 期的 DNA 含量是 4C。利用 PI 标记的方法，通过流式细胞仪对细胞内 DNA 的相对含量进行测定，可分析细胞周期各时相的百分比。

实验材料 HeLa 细胞

试剂、试剂盒 乙醇 RNase-A PI PBS

仪器、耗材 流式细胞仪 细胞培养设备 离心机 水浴 冰箱 注射器 离心管 封口膜 微量移液器

实验步骤 一、取对数生长期细胞，倒去培养液，胰酶适度消化细胞，用培养液吹打，800 rpm，离心 15 min 去上清。

二、PBS 洗 2 次，加 0.5 mL PBS 吹匀，务必吹散。

三、用 5 mL 注射器将细胞吸起，用力打入 5 mL 70%(预冷)乙醇中，封口膜封口。4°C 固定过夜（可长至 2 周）。

四、800 rpm 15 min 收集固定细胞，PBS 洗 2 次。

五、用 0.4 mL PBS 重悬细胞并转至 Tube 中轻轻吹打（防止细胞破碎）。

六、加 RNase-A 约 3 μ L 至终浓度约为 50 μ g/mL，37°C 水浴消化 30 min；

七、加 PI 约 50 μ L 至终浓度约为 65 μ g/mL，在冰浴中避光染色 30 min。

八、用 300 目（孔径 40~50 微米）尼龙网过滤，上机检测。

九、样品分析测定及打印。

其他 一、常见问题

1. Q: 要做胃粘膜组织的 DNA 含量及倍体检查，但取材后要等几个星期才会做流式细胞术检查，请问：胃组织要怎样保存好呢？用低温保存，还是用乙醇固定？或者固定后再低温下保存？

A: 我做过乳腺细胞的 DNA 含量测定，取得组织以后，先处理成单细胞悬液，然后再加 70% 冰乙醇固定，要保证冰乙醇的最终浓度为 50%，这样固定的细胞悬液可以至少保存 12 小时，最多可保存一个月，上机检测前再加 PI 综合染液。我就是这样做的，保存了将近三个星期，结果还可以，变异系数为 5%。

2. 实验中想用 PI 分析细胞周期及凋亡率，请教几个问题：

Q: (1) 所用的 RNAs 酶用什么配制呢？用 PBS 配吗？

A: RNaseA 用 PBS 配制没有问题，但是注意要沸水浴去除 DNase 的活性。

Q: (2) 测细胞周期和凋亡率时都要用 RNAs 酶，可以一起检测吗？

A: 用流式细胞仪测定时细胞周期和凋亡率是同时测定的, 不用担心。

Q: (3) Triton - x - 100 是固定剂吧, 用了 70%的冷乙醇 (是 4°C吗?), 是不是就不用 Triton - x - 100 固定了?

A: Triton X-100 是起透化作用的, 不是固定剂, 可以用 75%的乙醇于-20 度固定。

Q: (4) 还要设什么内参标准 (5%鸡红细胞) 吗?

A: 对照肯定是要的, 这个根据自己的需要进行设置。

Q: (5) 不用试剂盒行不行啊?

A: 完全可以不用试剂盒。

以下提供一个自己的实验步骤供参考:

- (1) 200×g 离心 10min 收集细胞;
- (2) 弃去上清, PBS 漂洗一次, 将细胞重悬于预冷的 80%乙醇中, -20°C 固定 24h 以上;
- (3) 进行流式细胞仪检测前, 200×g 离心 10min 收集固定后的细胞;
- (4) PBS 洗涤一次, 200×g 离心 10min 收集细胞;
- (5) 将细胞重悬于含 100ug/ml RNase A 和 50ug/ml PI 的 PBS 中, 室温孵育 30min;
- (6) 将经 PI 染色和 RNase A 消化后的细胞悬液用 300 目的尼龙膜过滤后即可利用流式细胞仪进行细胞周期分布和凋亡细胞定量的分析。

3. Q: 流式检测细胞周期时加 RNA 酶所需的温度?

A: 其实有关 RNA 酶在凋亡检测制样过程中使用的必要性问题尚有人持不同意见, 该观点的人认为 RNA 酶在环境中无所不在, 常规制样过程中所接触的试剂和环境中的 RNA 酶已足以降解样品中的 RNA, 所以为了简便实验操作, 也有人不加 RNA 酶或如你所参考的方法将其与 PI 染液一起使用。不过经典的方法还是 “先加 RNA 酶 37 度孵育 30min, 然后加

PI 4 度孵育 30min”。

至于染色时使用 4 度，是因为低温可减弱分子运动，增强荧光染料结合的稳定性和减少可能的荧光损耗。上流式前细胞用 75%乙醇固定行吗？

4. Q：我养肿瘤细胞，测周期。看到帖子说 70%乙醇必须用 PBS 和乙醇配，用水配细胞会碎裂，有帖子说 PBS 和乙醇配会出现絮状物。上流式前细胞用 75%乙醇固定，就用买来的现成的瓶装 75%乙醇，行吗？必须那么严格吗？

A：先用冷 PBS 悬浮细胞，大约 1-2ml，充分悬浮，使细胞充分分散成单细胞。之后缓慢加入无水乙醇，终浓度为 70-75%乙醇。不直接加 75%乙醇的原因是：直接加入乙醇会导致细胞团聚的现象，很难重悬成单细胞。乙醇固定之后没有细胞沉淀。

5. Q：我要做流式分析细胞周期，我大概收集了 10^6 的 6 次方细胞，但细胞在乙醇固定之后，还看到有细胞沉淀的，但 PBS 洗涤两次之后，就基本没什么细胞沉淀了，上机发现就发现不了细胞了。这是怎么回事啊？怎么解决这个问题啊？

A：很可能是洗细胞的过程中丢失了，解决办法有：

(1) 尽量采用尖底的离心管和水平离心机

(2) 离心后尽量用吸管吸取上清，不要倾倒；吸上清时最好残留 1mm 左右的水膜，不要吸完。

(3) 离心的转速或时间可稍微增加一点儿

(4) 每次加抗体时，吸头最好不要接触液面；混匀时最好不要用吸头吹打，以免吸头挂壁带走部分细胞。