西安百萤生物科技有限公司(Xi'an Biolite Biotech, Ltd.)
西安经济技术开发区草堂科技园二区 9-20401
Tel: 029-68064558; Fax: 029-68064559.
http://www.xabiolite.cn

活细胞——流式细胞仪周期分析

今天百萤生物带您了解一下流式在活细胞上的应用。流式细胞术是一种常用的技术，可根据其物理和化学特征分析复杂细胞群。当与荧光标记组合时，可以根据各种参数监测和定量评估细胞组分，例如大小，内部复杂性或通过特定细胞标记物（例如脂质，蛋白质或 DNA 含量）的表达。在利用 DNA 结合染色的应用中，流式细胞术分析具有根据细胞 DNA 含量筛选，表征和荧光分选整个细胞群的能力。这对于解决细胞周期主要阶段的细胞分布尤其重要，估计以分数 DNA 含量为特征的凋亡细胞的频率，并揭示分析的细胞群的倍性。从该方法收集的数据已经证明在关注细胞生长和发育，增殖和肿瘤发生，细胞周期调节，药物发现和肿瘤学的研究领域中非常有用。

真核细胞周期

真核细胞周期包括细胞生长，复制和分裂的一系列事件。它描述了细胞通过分裂循环的进展，分裂循环由细胞质和核事件控制，受细胞周期蛋白依赖性激酶及其细胞周期蛋白伴侣控制[2]。在给定的群体中，细胞将分布在细胞周期的三个主要阶段中：G_0 / G_1期，S 期和 G_2 / M 期。细胞周期的这些阶段中的细胞分布取决于它们在细胞 DNA 含量上的差异，并且借助于 DNA 结合染色，可以高灵敏度地定量评估这些变异[3]。

在流式细胞术中，细胞 DNA 含量被称为 DNA 倍性。在预复制 G_0 / G_1期，细胞通过合成 RNA 和蛋白质诱导生长，而 DNA 含量保持不变。在细胞周期的这个阶段，细胞具有 1 的 DNA 倍性，并且当染色时，显示出与其 DNA 含量成比例的荧光强度。已进入细胞周期的 G_2 / M 期的细胞含有双倍量的细胞 DNA。因此，这些细胞的 DNA 倍性等于 2，因此荧光强度是 G_0 / G_1期细胞的两倍[4]。在 S 期，细胞经历 DNA 复制并含有不同量的 DNA（超过 G_0 / G_1相细胞但少于

G_2 / M 期细胞）。S 期细胞的特征在于 DNA 倍性在 1 至 2 之间，并且表现出的荧光强度大于 G_0 / G_1 期细胞但小于 G_2 / M 期细胞。

用于细胞周期分析的 Supravital 染色

分析活细胞中的细胞周期进展需要使用细胞渗透性 DNA 结合染料。在该方法中，将细胞与化学计量结合至 DNA 的染料一起温育。这意味着染料与每个细胞中存在的 DNA 的量成比例地结合，并且当被激光激发时将产生与其细胞 DNA 含量成比例的信号。传统上，使用 Hoechst 染料进行活细胞中的流式细胞术细胞周期分析。虽然细胞渗透性，但 Hoechst 染料需要紫外线激发，这会破坏细胞 DNA 并增加其他通道中的背景干扰。

为了解决这个限制，AAT Bioquest ®已经开发出三种 **Cell Meter™荧光活细胞周期检测试剂盒**用于常见的 405nm 紫激光或 488nm 蓝光激光。这些分析是活细胞中 DNA 含量流式细胞仪分析的理想工具，因为它们在细胞周期的各个阶段进行。利用与前述相同的方法，将细胞群与化学计量结合的，细胞可渗透的 DNA 染料一起温育。在 DNA 结合后，染料将经历显着的荧光增强，发出与细胞 DNA 质量成比例的信号。可以通过流式细胞术确定给定样品中处于 G0 / G1 期，S 期和 G2 / M 期的细胞百分比，以及凋亡前的亚 G1 期细胞。收集的荧光数据可用于生成直方图，说明循环的每个阶段中细胞的分布（图 1）。

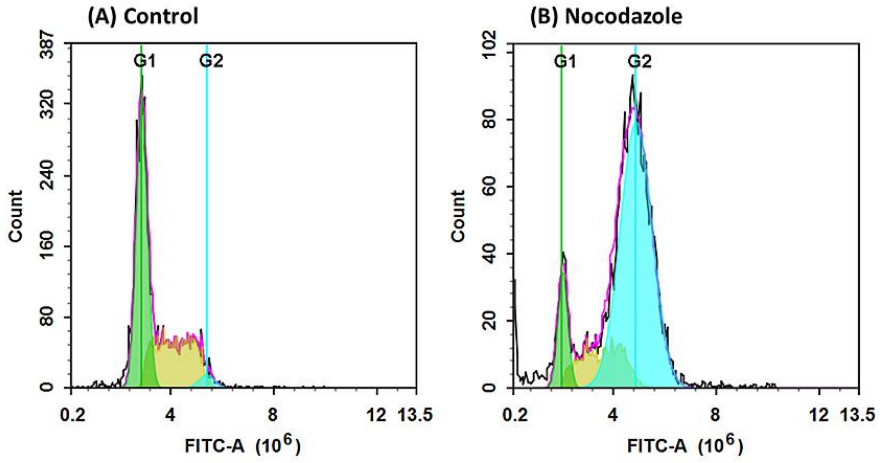

图 1.生长和诺考达唑处理的 Jurkat 细胞中的 DNA 图谱.Jurkat 细胞不具有（A）或具有在 37℃，5%CO 2 培养箱中培养 24 小时 100 毫微克/毫升诺考达唑 （B）进行处理，然后染料装载有核绿色™CCS1 30 分钟。使用 FITC 通道，用 ACEA NovoCyte 流式细胞仪测量核绿色 ™ CCS1 的荧光强度。在生长 Jurkat 细胞（A）中，用核绿 ™CCS1 染色的核显示出 G1，S 和 G2 期。在诺考达唑处理的 G2 阻滞细胞（B）中，G2 细胞的频率显着增加，G1 和小号期的频率显着下降。

使用 Cell Meter™荧光活细胞周期分析标记活细胞群的方案简单且稳健。因为这些染料是 DNA 选择性的，所以不需要对细胞群进行 RNA 酶处理以减少背景干扰。另外，核 Violet ™，Nuclear Green ™ CCS1 和 Nuclear Red ™ CCS2（每种试剂盒的染料组分）作为预配制溶液提供，因此不必重构。只需将细胞与染料一起孵育，然后使用流式细胞仪监测细胞群，无需洗涤。

Cell Meter™荧光活细胞周期分析的另一个明显优势是流式细胞分析中多路复用应用的能力。Cell Meter™荧光活细胞周期分析有三种不同的颜色选择，可用于紫激光或蓝光激光。这些选项使研究人员能够灵活地在其流式细胞仪上指定其他通道，以分析不同的参数。Nuclear Violet™染色利用通常可用的 405 nm 激发源，而 Nuclear Green™CCS1 和 Nuclear Red™CCS2 染色利用 488 nm 激发源。这使得能够同时共染色细胞群用于其他参数，例如 GFP 细胞的分析，CFSE 细胞追踪，细胞分选和免疫表型分析。甲荧光光谱观察者可以帮助确定用于多重分析的理想染料组合。正在考虑的荧光团应具有最小的光谱重叠，以减少任何渗透或溢出效应。

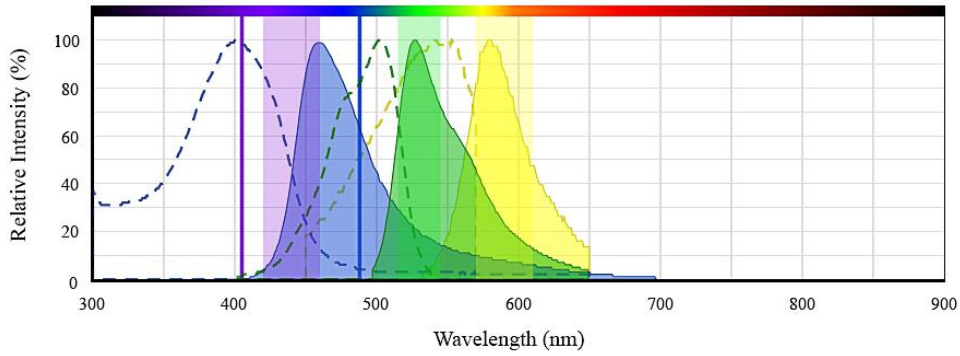

图 2. Nuclear Violet™，Nuclear Green™CCS1 和 Nuclear Red™CCS2 的激发和发射光谱。Nuclear Violet™被 405 nm 紫激光有效激发，可以使用 DAPI 通道进行可视化。Nuclear Green™CCS1 被 488 nm 蓝色激光有效激发，可以使用 FITC 通道进行可视化。Nuclear Red™CCS2 被 488 nm 蓝色激光有效激发，可使用 Cy3 / TRITC 通道进行观察。

附:

细胞样品制备：流式细胞术测定

应根据个体评估每个细胞系以确定最佳细胞密度。为了从板上分离贴壁细胞，建议使用 0.5 mM EDTA。可以考虑酶试剂（例如胰蛋白酶，Accutase ™），但需要进行测试以确保细胞表面上的目标受体不受影响。

贴壁细胞

1. 在使用前一天在细胞生长培养基中平板细胞为 400,000 至 800,000 个细胞/ mL。

非贴壁细胞

1. 离心细胞并小心丢弃上清液（即培养基）。
2. 将细胞沉淀重悬于 500µL - 1 mL 细胞生长培养基或 HHBS 中，浓度为 500,000 至 1,000,000 细胞/ mL。

流式细胞仪活细胞周期分析的样本方案

1. 对于每个样品，将细胞制备在 0.5 mL 温热培养基或所选缓冲液中，密度为 5×10 ^{5}至 1× 10 ^{6}个细胞/ mL。
   一个。注意：应对每个细胞系进行单独评估，以确定诱导细胞凋亡的最佳细胞密度。
2. 用测试化合物处理细胞一段所需的时间以诱导细胞凋亡或其他细胞周期功能。
3. 将 2.5μL 的 200X Nuclear Green ™ CCS1（组分 A）加入含有生长培养基的细胞中，并将细胞在 37℃，5%CO 2 培养箱中孵育 30 至 60 分钟。
   一个。注意：对于粘附细胞，用 0.5 mM EDTA 轻轻提起细胞以保持细胞完整，并在与 Nuclear Green™CCS1 孵育之前用含血清的培养基洗涤细胞一次。
   湾 注意：适当的孵育时间取决于所使用的单个细胞类型和细胞浓度。优化每个实验的孵育时间。
   C。注意：由于 Nuclear Green™CCS1 具有细胞渗透性，因此无需在 DNA 染色前固定细胞。
4. 可选：将细胞以 1000 rpm 离心 4 分钟，然后将细胞重新悬浮于 0.5 mL 测定缓冲液（组分 B）或您选择的缓冲液中。
5. 使用 488nm 蓝色激光（Ex / Em = 490 / 525nm）通过流式细胞术监测荧光强度。感兴趣的细胞门，不包括碎片。

相关产品

活细胞周期检测试剂盒				
品牌	货号	特点	Ex(nm)	Em(nm)
AAT	22841	荧光法/绿色荧光	503	526
AAT	22845	荧光法/405nm 激发	401	459
AAT	22860	荧光法/红色荧光	488	615

百萤生物（Biolite），是 AAT Bioquest 中国区域一级代理商，为国内提供 AAT 的原装产品及产品定制、技术服务，欢迎咨询、订购！