

Countstar® FL 在细胞周期定量分析中的应用

简介:

通过检测 DNA 上结合染料的含量来判定细胞内 DNA 的含量一直是细胞周期分析常用的方法。碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂，常用于细胞周期分析，它是一种溴化乙啶的类似物，在嵌入双链 DNA 后释放红色荧光。尽管 PI 不能通过活细胞膜，但却能穿过破损的细胞膜而对核染色。细胞在分裂过程中，不同时期的细胞所含 DNA 含量不同，如：G0/G1 期 DNA 含量为 2N，G2/M 期 DNA 含量为 4N，S 期 DNA 含量为 2N~4N 之间，根据 DNA 上结合染料的荧光强度来判断细胞周期的分布。诺考达唑（Nocodazole）是一种常用的细胞周期阻滞剂，本应用中被用于阻滞 MCF7 的 G2 期细胞。Countstar® FL 是一款基于图像分析，简洁直观，多功能为一体的细胞分析仪（如图一所示），可以获取准确的细胞周期实验数据，同时也可以通过细胞活力数据分析药物的毒性。



图 1: Countstar® FL 应用点介绍

材料:

Countstar 产品

Countstar® FL 细胞分析仪

Countstar® 样品板

Countstar® 细胞周期检测试剂盒 (CS02001-50)

0.2% 台盼蓝染色液 (CS0101001-50)

其他材料

MCF7 细胞 (ATCC)

诺考达唑 (Sigma-M1404)

DMEM 细胞培养基 (Hyclone-SH30243.01)

胎牛血清 (Hyclone-SH30084.03)

胰酶 (Hyclone-SH30042.01)

软件

DeNovo® FCS Express 5 Image

GraphPad Prism5®

方法:

细胞培养基

MCF7 细胞培养在完全培养基中, 组成为: 500ml DMEM 培养基, 2 mM L-谷氨酰胺, 1.5 g/L 碳酸氢钠和 10% 胎牛血清。

药物处理

1. 将 MCF7 细胞接种在 6 孔板中, 密度为 300,000 细胞/孔, 随后将细胞培养板孵育在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中 24 小时。
2. 24 小时后去除旧培养基并加入含有七种不同浓度诺考达唑的新鲜细胞培养液。先将诺考达唑溶解于 DMSO 中, 浓度为 400 μM, 然后以 2.5 倍进行梯度稀释, 再将七种不同浓度的诺考达唑加入到新鲜培养基中, 最高终浓度为 400 nM, 每个浓度设置一个复孔, 另外两个 DMSO 孔作为阴性对照。继续孵育培养板在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中 16 小时。

染色步骤

1. 细胞活力实验

用台盼蓝染色实验检测不同浓度的诺考达唑对 MCF7 细胞的毒性作用。去除旧培养基并用 PBS 洗一次，随后用胰酶进行消化。将重悬后的细胞样品与 0.2% 台盼蓝溶液 1:1 混合，随后取 20 μ l 混合液加入到样品板中，并用 Countstar® FL 内置的台盼蓝程序进行检测。

2. 细胞周期实验

- 1) 根据细胞活力实验中每个样品的细胞计数结果，制备 300,000-500,000 个细胞/样品用于细胞周期分析；
- 2) 将每个样品 400 g 离心 5 分钟，吸去上清并用 200 μ l PBS 重悬；
- 3) 400 g 离心 5 分钟，吸去上清并用 200 μ l 的 60% 乙醇 4°C 处理 1 小时；
- 4) 400 g 离心 5 分钟，吸去上清并用 200 μ l PBS 洗一次；
- 5) 400 g 离心 5 分钟，吸去上清并用 100 μ l 含有 1 μ l PI 和 0.5 μ l RNase A 的细胞周期缓冲液重悬每个样品，在 37°C 避光条件下孵育 30 分。取 20 μ l 混合液加入到样品板中，并用 Countstar® FL 内置的细胞周期程序进行检测。

Countstar® FL 分析

1. 每个样品的细胞数和细胞活率用内置的“台盼蓝计数”明场模块进行分析。
2. 细胞周期模块的通道设置为 PI 红色通道，激发波长为 525nm，发射波长为 600LP，每个样品采集三个视野。利用 Countstar® FL 测试完毕后，数据可以导出并用 De Novo®的 FCS Express Image 5 软件进行下一步分析（如图 2）。

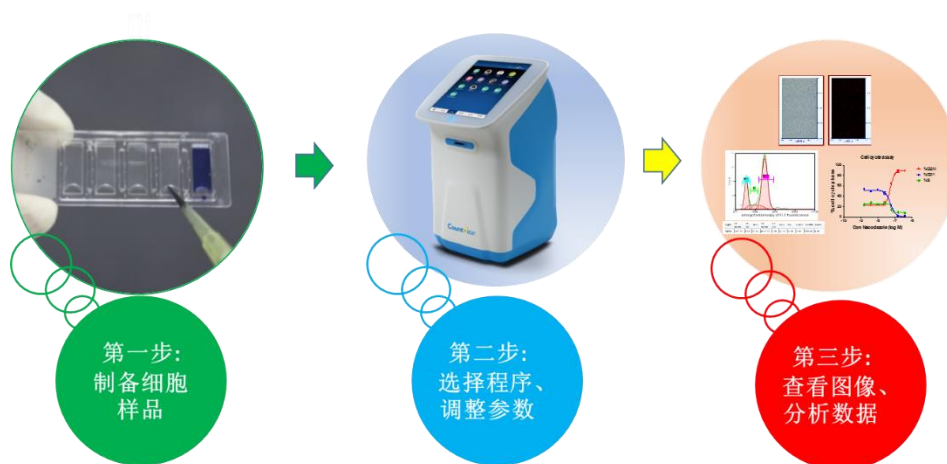


图 2. 细胞周期实验过程

诺考达唑对 MCF7 细胞的毒性作用

细胞活力实验通常被用于评价抗增殖效果和药物的毒性作用。如图 3 所示，诺考达唑的毒性作用可用实验组活细胞数/对照组活细胞数的百分比描述，IC₅₀ 值可通过 Graphpad Prism5®软件进行分析计算。

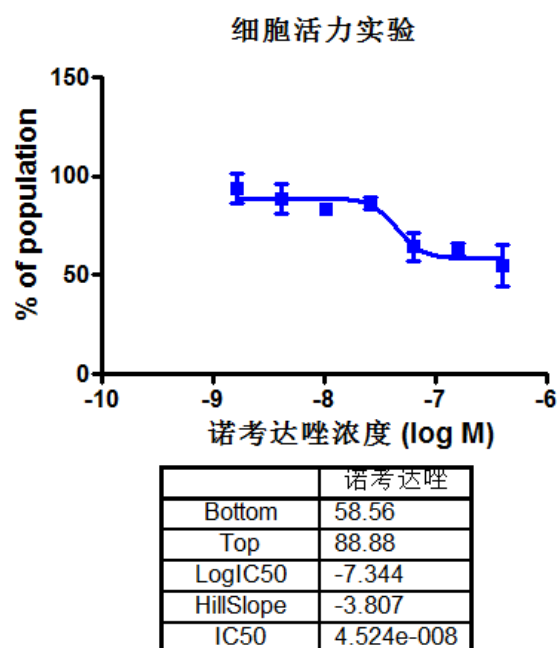
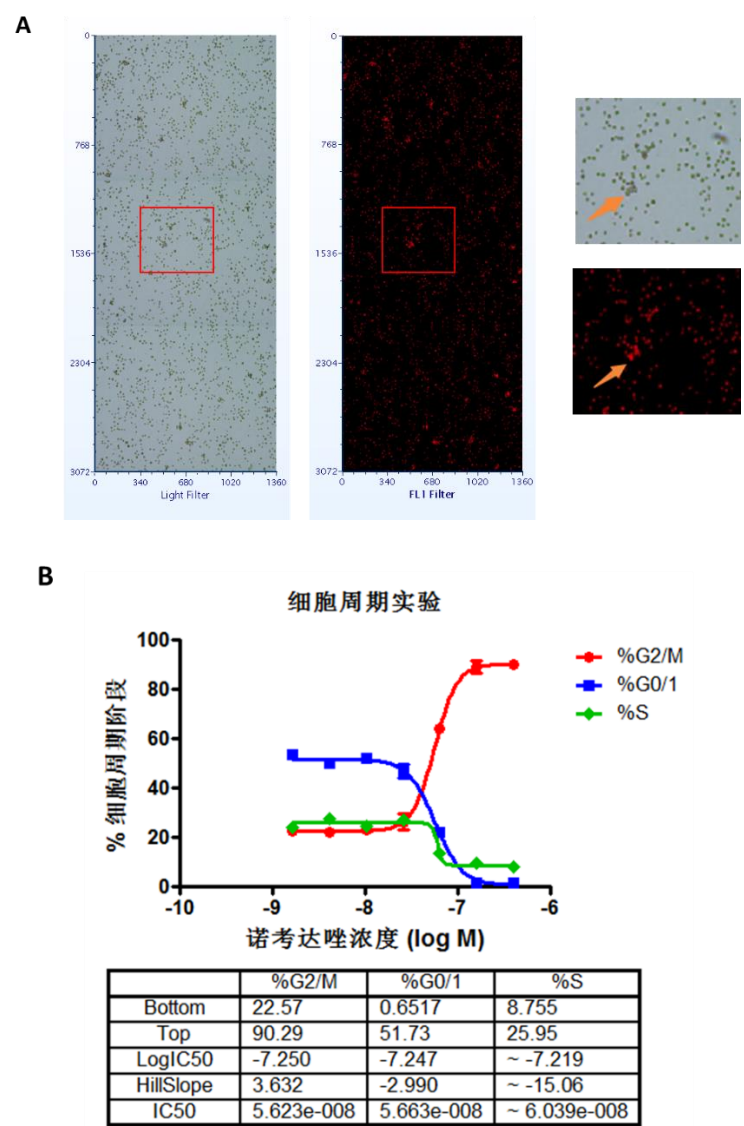


图 3. 诺考达唑对 MCF7 细胞的毒性作用

Countstar® FL 定量分析细胞周期

细胞分裂过程中 DNA 含量的不同可通过结合在 DNA 上染料的相对荧光强度来决定，本实验中不同浓度的诺考达唑被用于阻滞 MCF7 的细胞分裂。Countstar® FL 的明场分析模块被用于识别每一个细胞，PI 通道被用于准确定量每一个细胞，即使样品中含有细胞团也可以准确定量（如图 4A）。结果显示诺考达唑明显降低了 G0/G1 期的细胞数量，轻微降低了 S 期的细胞数量，相对则明显增加了 G2/M 的细胞数量（如图 4B）。如图 4C 所示，DMSO（阴性对照），64 nM 和 400 nM 诺考达唑等样品被用于举例说明细胞周期阻滞的分布图。



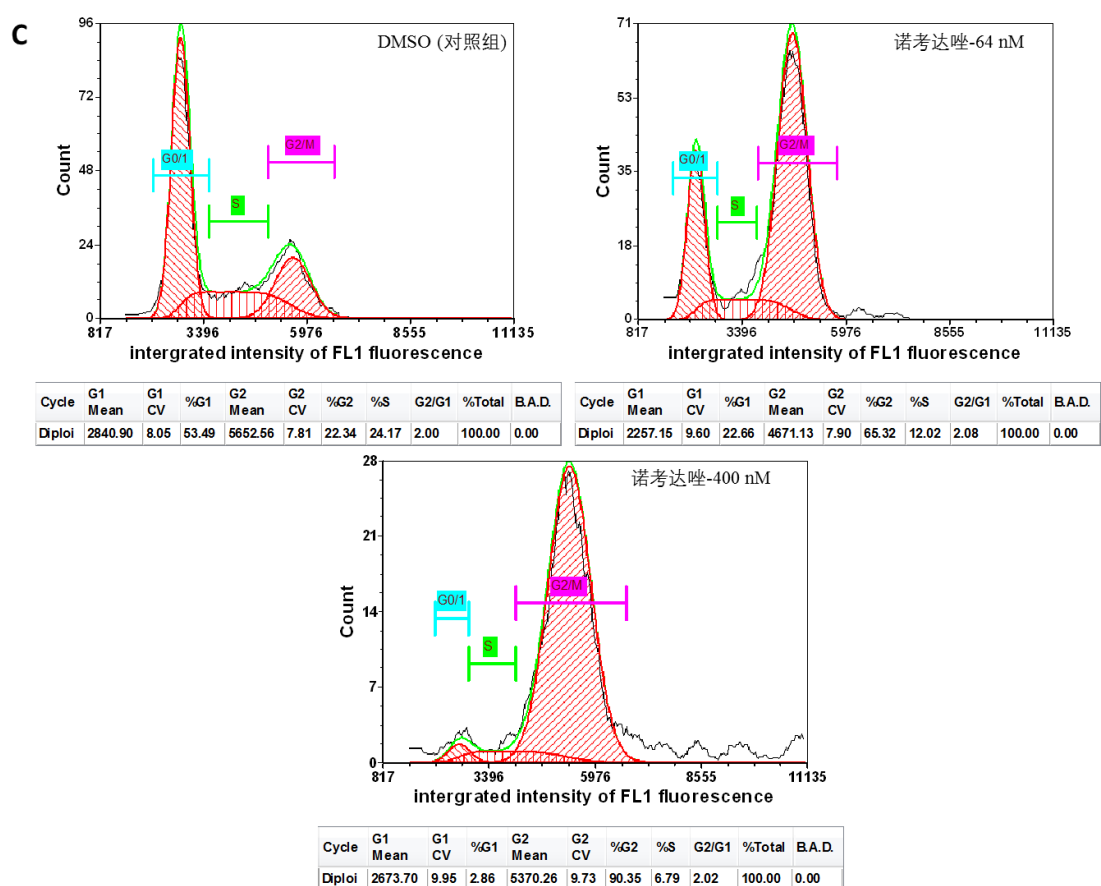


图 4: **A.** 从 Countstar® FL 上获取的明场通道和 PI 通道下的视野图像。**B.** 不同浓度的诺考达唑下各细胞周期的分布曲线。**C.** DMSO (阴性对照), 64 nM 和 400 nM 诺考达唑样品的细胞周期阻滞分布图。

总结:

Countstar® FL 可用少量的细胞样本即可准确分析细胞周期阻滞剂的剂量依赖效果。FCS Express 5 Image® 软件具有 FlowJo® (FlowJo LLC)类似的功能, 可用峰形图展示不同细胞周期分布的百分比。相对于其他的分析仪器, Countstar® FL 给用户提供了一种稳定, 可靠, 高性价比的选择。另外, Countstar® FL 提供扩展功能, 用户可以根据自身需要进行定制。Countstar® FL 是一款高度可移动的设备, 内置多种预设程序, 便于用户快速获取准确, 稳定, 可高度重现的数据。所有的模块简单易用, 大大简化了常规实验室的工作, 给客户id提供高质量的科研数据。

网址: <http://www.countstar.cn>

上海睿钰生物科技有限公司总部

电话: +86-021-33735070

传真: +86-021-52261001

邮件: marketing@countstar.cn

地址: 上海市松江区沈砖公路 6000 号创异工房 C3 栋 301 室, 201619

睿钰生物科技有限公司欧洲分部

电话: +49-160-97847082

传真: +49-5225-8714881

邮件: bodo.kohring@countstar.cn

地址: Bachstraße 16, 32139 Spenge, Germany

Countstar® FL 仅限用于科研!

