**Cell cycle protocol**

原理：利用DNA染料PI对细胞进行染色，荧光强度和DNA含量成正比，根据荧光强度的变化来判断细胞处在细胞周期的哪个阶段。根据细胞周期的不同状态，如果G0/G1期细胞的荧光强度为N，则S期细胞的荧光强度处于N～2N之间，G2/M期细胞的荧光强度为2N。

1. 收集细胞：胰酶消化细胞并4 ℃离心10分钟1000 rpm去上清（检测细胞周期时使用的细胞可以多一些，至少为6孔板一个孔的细胞），手法轻柔以减少碎片，不可过度吹打细胞；
2. 用预冷的PBS洗两次细胞；
3. 固定：预冷70%的乙醇溶液，将5 ml 70%的冷乙醇逐滴加入到细胞中，涡旋时混匀细胞，确保所有细胞的固定，并最大程度地减少结块，获得固定好的单个细胞，4 ℃避光过夜（至少18小时）；
4. 从4 ℃取出细胞，4 ℃离心10分钟1000 rpm去上清，再用预冷的PBS清洗两次以除去固定液残留（弃上清时要小心细胞损失，尤其是在乙醇离心之后）；
5. 加入500 µl FxCycleTM PI/RNAse 混匀；室温避光孵育15-30分钟；
6. 1小时之内上流式细胞仪检测，如果暂时不检测可先避光4 ℃保存。