

细胞周期流式检测(-)

一. 实验目的

本实验旨在利用细胞周期检测试剂盒 (Cell Cycle Staining Kit), 检测T24野生型细胞株及低、中、高耐药T24-RC48细胞株加药前后的细胞周期分布, 分析耐药细胞株的周期变化, 为揭示膀胱癌ADC耐药机制提供实验依据。

二. 实验内容

2.1 实验设计 同细胞周期流式检测(-)

2.2 测定原理 在细胞周期中, G_0/G_1 期细胞的DNA含量为 $2N$, S期细胞的DNA含量介于 $2N$ 到 $4N$ 之间, G_2/M 期细胞的DNA含量为 $4N$ 。细胞周期检测试剂盒使用DNA结合染料碘化丙啶(PI), 对细胞进行染色, 通过流式细胞仪检测细胞的DNA含量, 从而得到细胞周期分布的直方图。通过比较前后的细胞周期分布直方图, 可以分析药物对细胞周期进程影响。

三. 材料与试剂

3.1 材料 枪头、15ml离心管均购自Axygen公司。

吸管购自国产公司

移液器: Eppendorf

10cm细胞培养皿 (Corning公司)

人膀胱移行细胞癌细胞株(T24)

低、中、高耐药细胞株 T24-RC48

3.2试剂 PBS、胰酶、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司

McCoy's 5A 培养基 (上海源培)

细胞周期检测试剂盒 (联科生物, CCS012)

四. 实验仪器 超净台 (苏州净化设备厂) 台式常温低速离心机

Eppendorf 公司流式细胞仪 (BD 公司, 非 C6 型)

五. 实验步骤

5.1 将 T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株分别接种于

6 个 100cm 细胞培养皿 (Corning 公司) 中。

5.2 24 小时后, 每种细胞取 3 皿正常换液, 另外 3 皿换成含有 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

维迪西妥单抗的完全培养基处理 36 小时。

5.3 弃去培养基, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。

5.4 加入胰酶消化细胞, 轻轻拍打使脱落。

5.5 收集每孔细胞悬液, 1000 rpm 离心 5 分钟, 弃上清。

5.6 用预冷的 PBS 离心洗涤细胞两次, 弃上清。

5.7 加入 1ml DNA Staining solution 和 10 μl Permeabilization solution, 涡旋振荡 5-10 秒混匀, 室温避光孵育 30 分钟。

5.8 上流式细胞仪检测。

5.9 使用 FlowJo 软件对流式细胞仪数据进行分析, 计算细胞处于各周期阶段占比, 并比较不同耐药组与野生型株分布差异。

六. 实验结果

在本次实验中各组细胞(T24野生型及低中.高耐药T24-RC48细胞株的空白对照组与药物处理组)经PI染色后,流式细胞仪检测结果显示所有样本均未呈现明显的DNA荧光信号。仅检测到低强度背景信号,与未染色样本的基线水平相似。

将染色时间延长到4h后上机复测,结果仍无改善,荧光信号强度未随染色时间延长而增加。