

实 验 报 告

实验名称：人胃癌细胞周期水平检测。

实验内容：运用流式细胞术检测不同组别 MKN45 细胞周期水平。

实验周期：2024 年 10 月 9 日～2024 年 10 月 21 日。

实验单位：潮新（南京）生物科技有限公司。

项目负责人：XXX

联系电话：XXX-XXXX-XXXX

电子邮箱：xxxxxxxxxxxxx@chaoxinbio.com

技术负责人：XXX

联系电话：XXX-XXXX-XXXX

电子邮箱：xxxxxxxxxxxxx@chaoxinbio.com

报告人：XXX 审核人：XXX 报告日期：2024 年 10 月 23 日

1. 实验材料

1.1 细胞（系/株）

人胃癌细胞：MKN45 细胞（武汉普诺赛，CL-0292， 1×10^6 cells/T25 培养瓶）

1.2 主要试剂

试剂名称	生产厂家	货号
RPMI-1640 培养基	武汉，普诺赛	PM150113
胎牛血清（FBS）	武汉，普诺赛	164210
青霉素-链霉素溶液	武汉，普诺赛	PB180120
0.25%胰蛋白酶	武汉，普诺赛	PB180225
磷酸盐缓冲液（PBS）	武汉，普诺赛	PB180327
无水乙醇	上海，国药集团	10009218
碘化丙啶（PI）染料	美国，Invitrogen	R37169
核糖核酸酶 A（RNAase A）	美国，ThermoFisher	EN0531

1.3 主要仪器设备

仪器设备名称	生产厂家	型号
超纯水仪	美国，Millipore	Milli-Q synthesis
4℃冰箱	青岛，海尔集团	BCD-416
-80℃超低温冰箱	美国，ThermoFisher	ULTS1368
高压灭菌锅	西安，仪创仪器	BXM-30R
二氧化碳培养箱	美国，ThermoFisher	3131
冷冻离心机	德国，Eppendorf	5417R
倒置相差显微镜	日本，Olympus	CKX31
流式细胞仪	美国，BD	FACSVerse

2. 实验方法

2.1 细胞培养

(1) 待细胞汇合度达到 70~90%时，弃掉培养瓶中的原培养基，加入无菌的 PBS 冲洗两次，加入 1 mL 的 0.25%胰酶，37℃孵育 1~2 min。

(2) 显微镜下观察到大量细胞呈圆形状态时，立即加入两倍胰酶量含血清的培养基，终止胰酶消化，倾斜培养皿或培养瓶，自上而下吹打，使未脱落的细胞脱离。

(3) 将培养瓶的液体转移到灭菌的 15 mL 离心管中，1000 rpm 离心 5 min。

(4) 将离心管上清液去掉，加入新鲜的培养基吹打均匀，使重悬于培养基中。

(5) 细胞计数：取少量细胞悬液，将细胞悬液滴入盖有盖玻片的血细胞计数板中间平台两侧的沟槽中，使细胞悬液充满盖玻片与计数板间（不要有气泡），静置 2~3 min，通过显微镜计算四个大方格（由 4×4 的小方格组成）中的细胞，计算细胞总量。

注：计算公式：细胞数/ml=四大格细胞总数/4×10⁴。

2.2 细胞处理

(1) 调整细胞密度为 2×10⁵/mL，将细胞接种于 6 孔板中，每孔加入 1 mL 培养基培养过夜，按照不同分组进行处理。

(2) 将各组细胞置于 37℃、5% CO₂ 条件下的细胞培养箱中培养 48 h 后，收集细胞。

(3) 用无 EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化细胞，移至离心管中，1000 rpm 离心 5 min 后，弃上清液。

(4) 加入预冷 4℃的 PBS 重悬细胞，1000 rpm 离心 5 min 后，洗涤细胞，弃上清。

(5) 离心弃上清后，加入少量 PBS 重悬细胞，再次加入-20℃预冷的 75%乙醇溶液，4℃固定细胞过夜。

2.3 染色

(1) 细胞经 1000 rpm 离心 5 min 后，弃上清液除去固定液。

(2) 加入预冷 4℃的 PBS 重悬细胞，1000 rpm 离心 5 min 后，洗涤细胞，弃上清，此步骤重复 2 次。

(3) 加入 500 μ L 的 RNAase (20 μ g/mL)，37℃孵育 30 min。

(4) 1000 rpm 离心 5 min 后，弃上清。

(5) 加入预冷 4℃的 PBS 重悬细胞，1000 rpm 离心 5 min 后，洗涤细胞，弃上清。

(6) 加入 50 μ g/mL 的 PI 染液，室温下避光染色 30 min，放置于冰上，等待上机检测。

2.4 上机检测

对 PI 荧光选择 PE 通路检测，各组细胞依次上流式细胞仪检测。

2.5 结果判定

先根据 SSC/FSC 图选择细胞群，之后对选择的细胞群进行作图。分别将 X 和 Y 轴设为 cell number 和 PI（表示细胞 DNA 含量）。流式结果图显示的第一个峰为 G0/G1 期细胞；流式结果图中第二个峰不高但跨度特别大的为 S 期；流式结果图中的第三个峰为 G2/M 期。

注：细胞周期就是从细胞分裂产生的新细胞生长开始，到下一次细胞分裂形成子细胞结束为止所经历的过程，主要分为 G0 期、G1 期、S 期、G2 期和 M 期。G0 期细胞是指处于相对静止时期的细胞，是二倍体细胞，含有二倍体量的 DNA；G1 期即合成前期，此时细胞在为下一次有丝分裂准备 DNA 合成所需的各种物质和能量等，细胞仍为二倍体；S 期即 DNA 合成期，DNA 的量经过复制增加一倍，所以 S 期细胞内的 DNA 处于从二倍体量到四倍体量的连续增加过程；G2 期即 DNA 合成后期，此时 DNA 合成已完成，细胞为四倍体；M 期即细胞分裂期，在分裂完成前，细胞仍为四倍体。

2.6 数据处理及统计学方法

以上实验进行三次生物学重复，实验所得计量数据采用“平均数 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)”表示。使用 GraphPad Prism 8.0 软件 (USA, GraphPad Software) 对所有数据进行统计分析、可视化作图。两组样本间的比较采用非配对 t 检验，多组样本间的比较采用单因素方差 (One-Way ANOVA) 检验， $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3. 实验结果

各组 MKN45 细胞周期水平比较结果见图 3.1。与 Group-A 组相比，Group-C 组 MKN45 细胞 G0/G1 期比例显著升高，S 期、G2/M 期比例均显著降低；Group-B、Group-D 组 MKN45 细胞 G0/G1 期、S 期、G2/M 期比例均未见显著性差异。

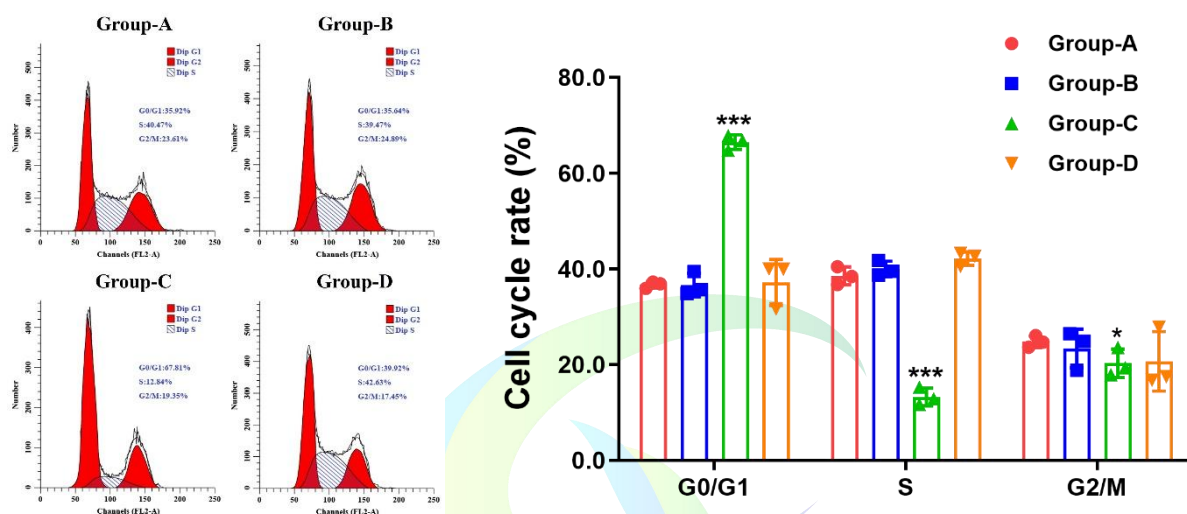


图 3.1 各组 MKN45 细胞周期水平比较结果 (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. Group-A, $n=3$)

实验数据附件

- （1）流式细胞仪下机 FCS 文件；
- （2）GraphPad Prism 8.0 软件处理数据；
- （3）主要试剂（盒）使用说明书；
- （4）其他实验文件。

