

细胞凋亡与增殖基础知识培训

大连美仑生物技术有限公司

2020年4月

目录

01

01

细胞增殖与活力检测

膜损伤检测
代谢活性检测
DNA合成检测
荧光标记检测
ATP水平测定

02

02

细胞凋亡与增殖检测

磷酸酰丝氨酸外翻检测
线粒体膜电位检测
DNA片段化检测
Caspase活性检测
荧光标记细胞形态检测

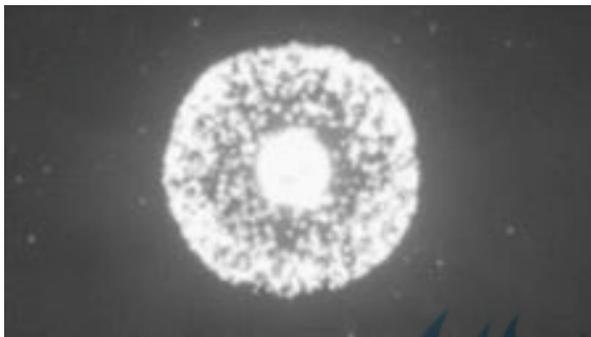


1

细胞增殖与活力检测

1. 膜损伤检测
2. 代谢活性检测
3. DNA合成检测
4. 细胞荧光标记检测

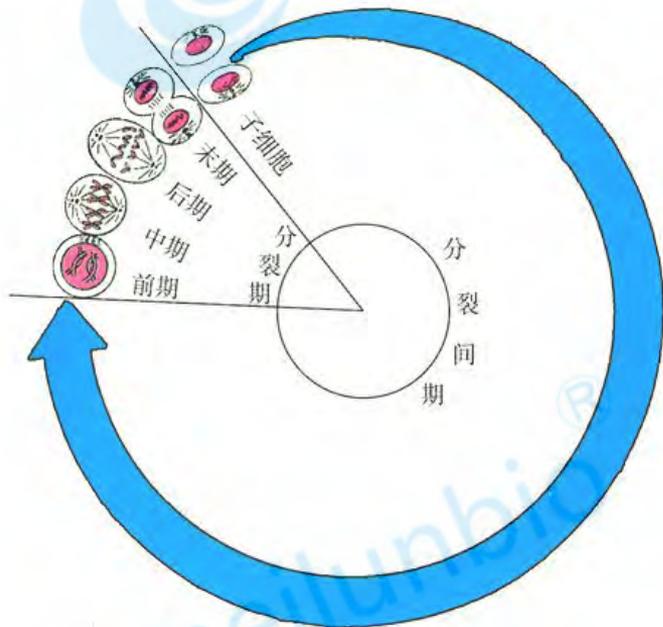
细胞增殖 (Proliferation) 是生活细胞的重要生理功能之一，是生物体的重要生命特征，是生物体生长、发育、繁殖和遗传的基础。



细胞以分裂的方式进行增殖。

真核生物的分裂方式：

- 有丝分裂：真核细胞增殖的主要方式
- 无丝分裂
- 减数分裂



通过检测细胞增殖可以了解细胞的生长速率和活力，对于细胞生长和分化研究至关重要。

在药物开发过程中也常被用于评估药物的毒性和对癌细胞生长的抑制情况。

- **膜损伤检测** 台盼蓝、LDH...
- **代谢活性检测** CCK-8、MTT...
- **DNA合成检测** CFDA SE、Calcein AM...
- **细胞荧光标记检测** BrdU、EdU...
- **ATP水平测定** CellTiter-Glo...

1. 膜损伤检测

用**台盼蓝**、中性红等染料对细胞进行染色，正常细胞会排斥台盼蓝，而丧失细胞膜完整性的细胞能被台盼蓝染色；中性红可以被活细胞所摄入，并在溶酶体中积累，在细胞受到损伤时，中性红的摄入能力会下降。通过计算染料摄取比例，就可以反应细胞的增殖或毒性情况。

细胞计数板



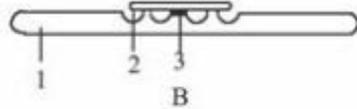
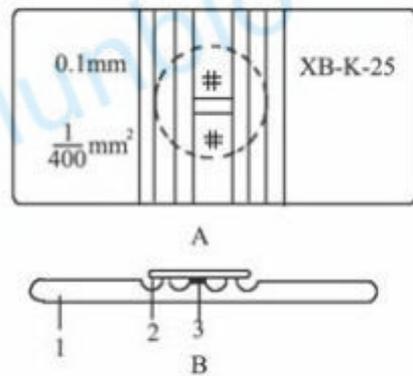
自动细胞计数仪



台盼蓝活死细胞计数——细胞计数板法

细胞计数板一般有二个 chambers，分别刻有 9 个 1 mm^2 大正方形，4 个角落之正方形再细刻为 16 个小格，深度均为 0.1 mm 。当 chamber 上方盖上盖玻片后，每个大正方形之体积为 $1\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 0.1\text{ mL}$ 。

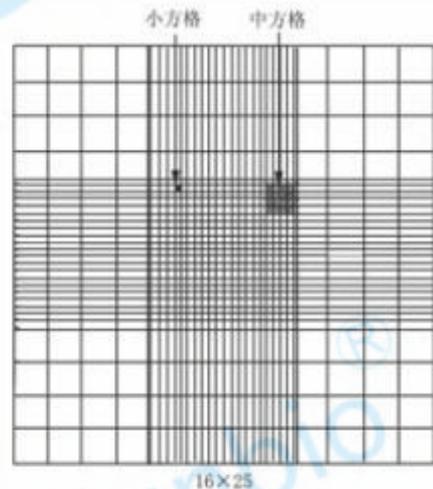
计数每个大正方形内之细胞数目，乘以稀释倍数，再乘以 10000，即为每 mL 中之细胞数目。



血细胞计数板构造 (一)

A. 正面图; B. 纵切面图

1. 血细胞计数板; 2. 盖玻片; 3. 计数室



血细胞计数板构造 (二)

放大后的方网格，中间大方格为计数室

台盼蓝活死细胞计数——细胞计数板法

- 1、取少许细胞悬液（约 15 μL ）自血球计数盘 chamber 上方凹槽加入，盖上盖玻片，于 100倍倒置显微镜下观察；
- 2、计数四个大方格之细胞总数，再除 4，乘以稀释倍数，最后乘以 10000，即为每 mL 中细胞悬浮液之细胞数。若细胞位于刻线上，只计上线与右线之细胞（下线与左线之细胞）。计算公式为：4 个大格细胞总数 \times 稀释倍数 \times 10000/4=细胞数/mL。

注意：

- （1）计数板计数时，最适浓度为 5 ~ 100000 细胞/mL，此范围外计数误差偏大。高浓度细胞悬液，可取出部分作稀释或连续稀释后计数。
- （2）吸管吸取细胞，让吸管在计数板一侧的凹槽处流出液体，至盖玻片被液体充满为止，不要溢出盖玻片，也不要过少或带气泡；（有人认为，10 μL 就可以被虹吸作用吸入且铺满计数板）。
- （3）移液器（20 μL 的微量加样器）吸取 20 μL 细胞悬液至计数板边缘，液体经虹吸作用进入凹槽。
- （4）静置半分钟再于显微镜下观察。



2. 代谢活性检测

通过在细胞中添加四氮唑盐，可以进行线粒体内脱氢酶代谢活性的测定，活细胞能将四氮唑盐（如MTT、XTT、WST-1、WST-8）还原为有色的甲瓖（Formazan），再通过分光光度计或酶标仪可以进行定量检测。**CCK-8**（基于WST-8）试剂盒能高度准确地检测细胞增殖，比MTT法及XTT法的灵敏度高5倍。



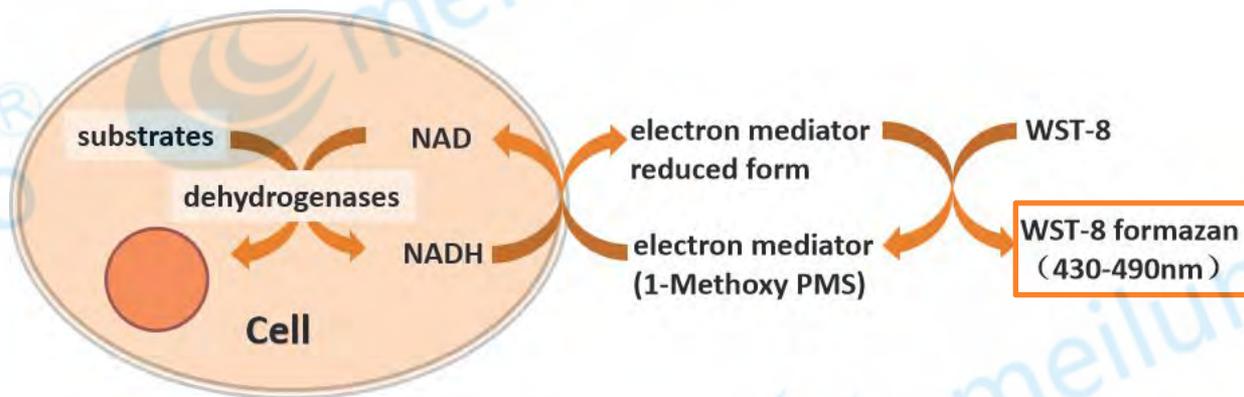
常用代谢类细胞增殖检测方法的比较

检测方法	MTT法	XTT法	WST-1法	CCK-8法 
甲瓚产物的水溶性	差（需加有机溶剂溶解）	好	好	好
检测灵敏度	高	很高	很高	最高
检测时间	较长	较短	较短	最短
检测波长	560-600nm	420-480nm	420-480nm	430-490nm
细胞毒性	高，细胞形态完全消失	很低，细胞形态不变	很低，细胞形态不变	很低，细胞形态不变
试剂稳定性	一般	较差	一般	很好
批量样品检测	可以	非常适合	非常适合	非常适合
便捷程度	一般	便捷	便捷	非常便捷

★ 细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8),增强型
(Meilunbio®货号 : MA0218)

Cell Counting Kit-8 (简称**CCK-8**) , 是一种基于**WST-8**而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测的试剂盒。

CCK-8试剂中含有的主要成分**WST-8**【2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐】在电子耦合试剂**1-Methoxy PMS**（1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓硫酸二甲酯）存在条件下，可以被线粒体内的**脱氢酶**还原为具有高度水溶性的**橙黄色**甲瓚产物**Formazan**，生成的**Formazan**数量与活细胞的数量成正比。用酶标仪在**450nm**波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。



细胞增殖越多越快，则颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。



1 在96孔板中每孔加入100 μ l的细胞悬液



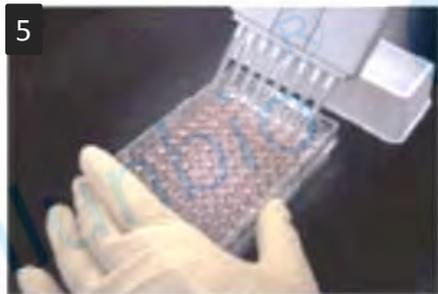
2 在培养箱中预培养细胞



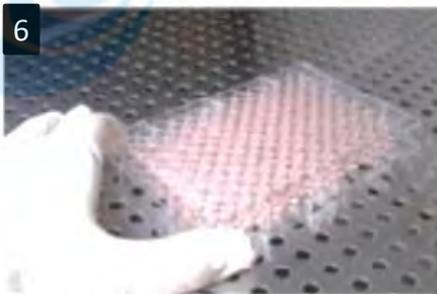
3 向培养板中加入药物



4 在培养箱中培养一段时间(可根据自己的实验情况调整)



5 向每孔加入10 μ l CCK-8溶液



6 在培养箱中培养一定时间



7 用酶标仪测定在450nm处的吸光度

数据整理:

细胞存活率 = $[(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100\%$

抑制率 = $[(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100\%$

As : 实验孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、待测药物) 的吸光度

Ac : 对照孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测药物) 的吸光度

Ab : 空白孔 (不含细胞和待测药物的培养基、CCK-8) 的吸光度

PTX浓度	空白孔	0	0.0001	0.001	0.01	0.1	0.5	1	10	100
	0.187	2.369	2.332	2.329	2.169	1.563	0.599	0.453	0.421	0.305
	0.184	2.322	2.337	2.296	2.147	1.621	0.606	0.476	0.414	0.288
	0.186	2.152	2.14	2.136	2.054	1.501	0.592	0.461	0.431	0.312
	0.186	2.264	2.248	2.127	1.984	1.466	0.597	0.468	0.449	0.309
	0.19	2.293	2.289	2.22	2.024	1.622	0.604	0.463	0.447	0.309
	0.181	2.092	2.073	2.011	1.929	1.503	0.601	0.472	0.457	0.316
平均	0.186	2.258	2.252	2.195	2.052	1.547	0.600	0.466	0.437	0.309
平均-空白		2.072	2.066	2.009	1.866	1.361	0.414	0.280	0.251	0.123
药物浓度($\mu\text{g/ml}$)		0	0.0001	0.001	0.01	0.1	0.5	1	10	100
吸光度		2.072	2.066	2.009	1.866	1.361	0.414	0.280	0.251	0.123
cell viability(%)		100.00	99.73	96.96	90.08	65.69	20.00	13.52	12.12	5.92
cell Inhibition(%)		0.00	0.27	3.04	9.92	34.31	80.00	86.48	87.88	94.08

计算IC50—spss软件用法

1

打开spss，建立变量。（需要建立三个变量，分别是浓度，抑制率，和总数。小数位数按照实际要求设置。如下图所示。）

名称	类型	宽度	小数	格式	值	缺省	列	行	度量标准	角色
1 浓度	数值(浮)	8	2	无	无	0	默认	默认	度量	输入
2 抑制率	数值(浮)	8	2	无	无	0	默认	默认	度量	输入
3 总数	数值(浮)	8	2	无	无	0	默认	默认	度量	输入

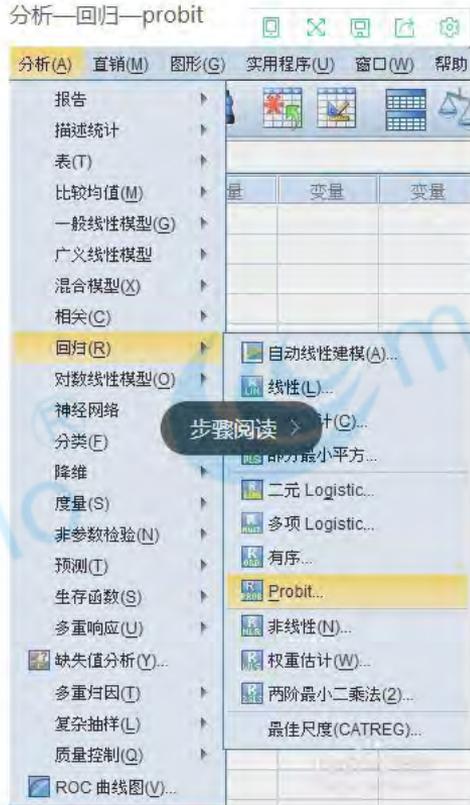
2

输入数据。总数用1或者100，其他按实际输入

	浓度	抑制率	总数
1	1.76	30.83	100.00
2	3.52	47.01	100.00
3	7.03	52.63	100.00
4	14.06	58.65	100.00
5	28.12	66.42	100.00
6	56.23	74.44	100.00
7	117.15	85.71	100.00

3 开始计算。

分析—回归—probit



计算IC50—spss软件用法

4

响应频率为抑制率，观测值汇总总数，协变量为浓度，转换选择对数底为10，模型选择logit



计算IC50—spss软件用法

5

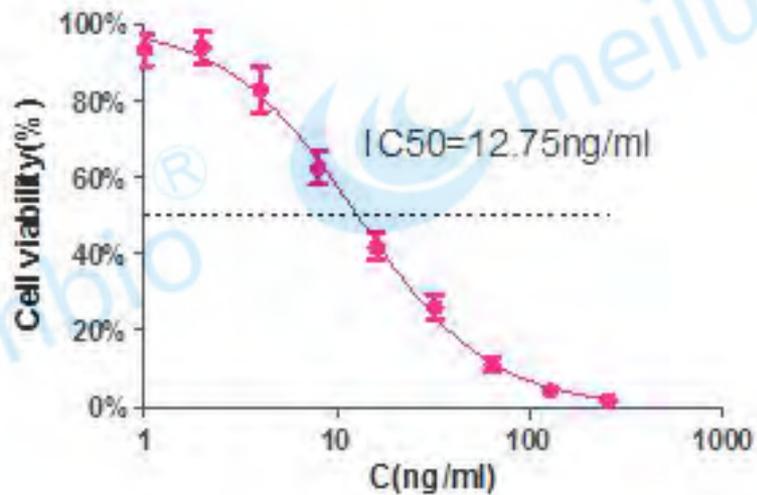
点击确定即可。

在弹出的输出界面的置信限制中找到概率0.50的估计浓度即为IC50。

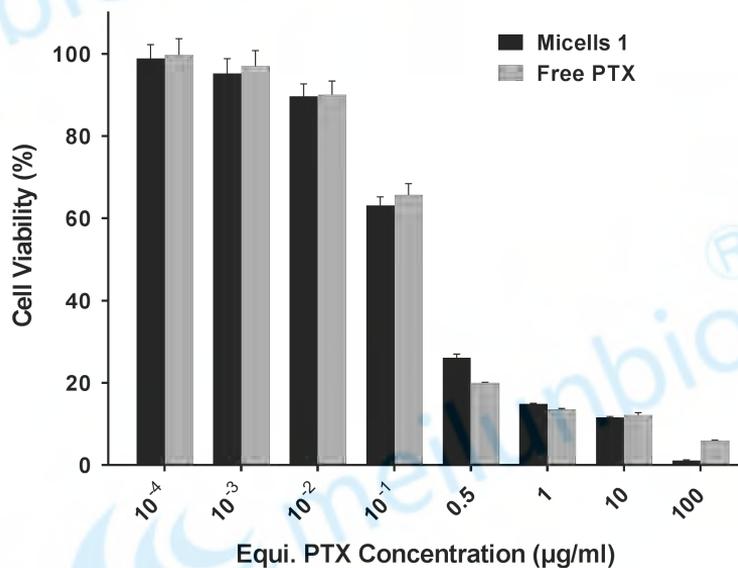
spss IC50 0.163 $\mu\text{g/ml}$

		置信限度					
		浓度的 95% 置信限度			log(浓度)的 95% 置信限度 ^b		
	概率	估计	下限	上限	估计	下限	上限
LOGIT ^a	.010	.000	.000	.002	-3.861	-7.812	-2.640
	.020	.000	.000	.005	-3.391	-6.796	-2.324
	.030	.001	.000	.007	-3.113	-6.197	-2.135
	.040	.001	.000	.010	-2.913	-5.769	-1.999
	.050	.002	.000	.013	-2.757	-5.434	-1.891
	.060	.002	.000	.016	-2.628	-5.158	-1.802
	.070	.003	.000	.019	-2.518	-4.923	-1.724
	.080	.004	.000	.022	-2.421	-4.718	-1.656
	.090	.005	.000	.025	-2.335	-4.535	-1.595
	.100	.006	.000	.029	-2.257	-4.370	-1.540
	.150	.011	.000	.049	-1.948	-3.720	-1.313
	.200	.019	.001	.073	-1.715	-3.238	-1.136
	.250	.030	.001	.104	-1.523	-2.847	-.982
	.300	.044	.003	.145	-1.355	-2.513	-.840
	.350	.063	.006	.199	-1.202	-2.219	-.702
	.400	.087	.011	.273	-1.059	-1.953	-.563
	.450	.120	.020	.381	-.922	-1.709	-.419
	.500	.163	.033	.546	-.788	-1.485	-.263
	.550	.222	.053	.811	-.654	-1.277	-.091
	.600	.304	.083	1.265	-.517	-1.082	.102
	.650	.422	.126	2.107	-.374	-.899	.324
	.700	.600	.189	3.804	-.222	-.723	.580

细胞存活率曲线:



细胞存活率柱状图:



1. CCK-8对于不同的细胞，灵敏度是否一样？

不一样，悬浮细胞与贴壁细胞相比较难显色。对于贴壁细胞，一般加入CCK-8培养0.5-4小时吸光度已经很高，但对于悬浮细胞则可能吸光度较低，可以通过延长CCK-8的加入时间或增加细胞数量来解决。

2. 哪些物质会影响CCK-8的测定？

当有氧化还原性物质存在时会影响CCK-8的测定，因此当所加药物为氧化还原性物质时需要换液再进行检测。

3. 如何设定空白对照？

在不含细胞的培养基中加入CCK-8，培养一定的时间，测定450 nm的吸光度即为空白对照。在做加药实验(细胞毒性实验)时，还应考虑药物的吸收，可在不含细胞，加入药物的培养基中加入CCK-8，培养一定的时间，测定450 nm的吸光度作为空白对照。

4. 每次测定的数值不一样，是什么原因？如何解决？

可能会有以下几个原因：

- 1) 当在培养箱内培养时，培养板最外一圈的孔最容易干燥挥发，由于体积不准确而增加误差。一般情况下，最外一圈的孔只加培养基，不作为测定孔用。
- 2) 有可能会因为CCK-8沾在壁上而产生误差，建议在加入CCK-8后，轻轻敲击培养板以帮助混匀。
- 3) 每孔的细胞数量过多或过少。请预先在1,000~100,000个/孔范围内摸索条件。
- 4) 重复试验请保证孵育时间、接种细胞数相同。

5. CCK-8能否检测细菌细胞？

可以检测E.coli，但不能检测酵母细胞。向100μl E.coli培养液中加入10 μl CCK-8溶液，并培养1-4个小时或过夜。

6. 怎样确定合适的接种细胞数和孵育时间？

当使用标准96孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为1,000个/孔。具体接种量和孵育时间需要通过制作标准曲线来确定，吸光度在0.2~2.5之前线性关系都很好，最佳吸光度是在1.0左右，找到标准曲线上1.0对应的细胞数，按照相同的孵育时间操作即可。

3. DNA合成检测

细胞的增殖生长伴随着DNA的合成，因此DNA的合成可以被用来检测细胞增殖、活力及凋亡。直接检测细胞中DNA的合成，即核苷渗入法是目前公认的最精确的检测细胞增殖的方法。DNA合成检测主要用到两种DNA合成掺入物：BrdU及EdU，它们都是胸腺嘧啶的非放射性类似物，能掺入到增殖细胞的DNA中，再通过对BrdU及EdU的检测进而对DNA的合成量进行测定



	BrdU	EdU
检测分子	大	很小，检测染料仅为BrdU抗体的 1/500
反应原理	免疫反应	化学反应
是否需要DNA变性	需要，变性DNA后才能与抗体结合，导致了DNA双链结构的破坏，染色弥散	不需要，有效避免变性带来的样品损伤，确保细胞核边缘清晰完。
兼容性	因其DNA结构破坏，影响其他染料标记	允许与多种抗体或荧光蛋白同时标记
实验时间	过夜	2.5 小时
检测灵敏度	一般	灵敏
检测准确度	一般	高
便捷程度	一般	便捷

★ EdU-488细胞增殖检测试剂盒 (Meilunbio®货号 : MA0424)

EdU-488细胞增殖检测试剂盒(Meilun EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 488), 是一种利用核苷渗入法对细胞增殖情况进行快速、简单、高灵敏检测的试剂盒。其原理为：试剂盒中的EdU(5-ethynyl-2' -deoxyuridine)是一种胸苷(T)类似物，EdU可以在在细胞周期的S期中替代胸苷掺入到新合成的DNA中；另一方面，EdU上的乙炔基能与叠氮化物(如荧光探针Alexa Fluor 488 Azide)通过Cu⁺的催化发生共价反应，形成稳定的三唑环，该反应非常迅速，被称作点击反应(Click reaction) (图1)。通过点击反应，新合成的DNA会被绿色荧光标记，然后通过检测荧光信号实现细胞增殖的检测。

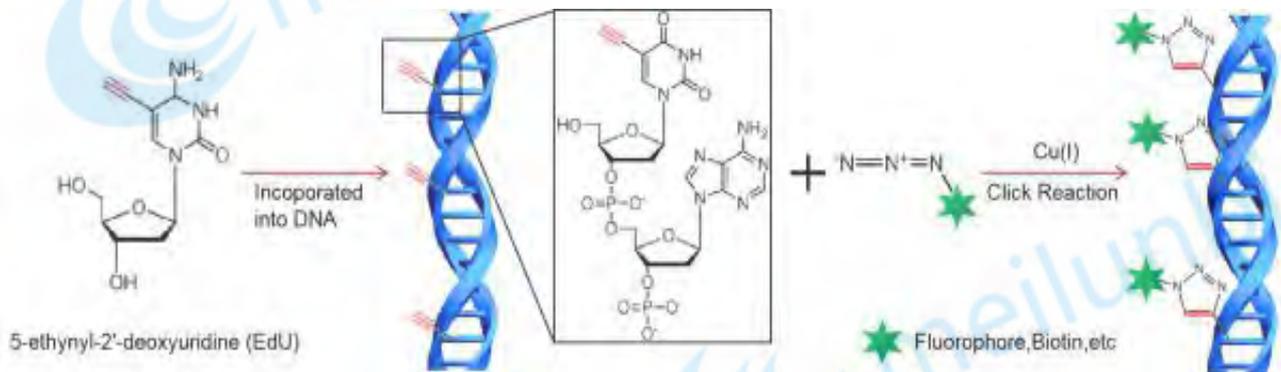


图1. EdU法中的点击反应原理图。掺入到细胞DNA中的EdU与荧光探针或生物素等标记的叠氮化物，在铜离子的催化下发生共价反应，形成稳定的三唑环，使细胞DNA标记上荧光探针或生物素。

1. 需自备试剂

- (1) 10mM PBS, pH7.2-7.6 (Meilunbio®货号 : MA0015)。
- (2) 固定液-----4%多聚甲醛in PBS (Meilunbio®货号 : MA0192)。
- (3) 洗涤液-----3% BSA in PBS, pH7.2-7.6。
- (4) 通透液-----0.3~0.5% Triton X-100 in PBS。
- (5) 去离子水或超纯水。

2. 检测体系的确定

(1) 以下操作步骤是以**6孔板**或**常规切片**检测体系为例的，如果使用其他容器，检测体系可以相应按比例调整，具体检测时Click反应液的使用量请参考表1。

(2) 以下操作步骤是以**贴壁细胞**或**组织切片**为例的，如果检测的是**悬浮细胞**，请按常规的悬浮细胞的操作方式进行，比如在相关步骤中增加离心步骤等。细胞数在10-100万的悬浮细胞可以使用500 μ l的检测体系，可以根据细胞数的多少相应调整检测体系。

表1. Click反应液的使用量参考

细胞接种容器	384孔板	96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板	5. 5cm ^{III}
Click反应液体积	20 μ l	50 μ l	70 μ l	100 μ l	200 μ l	500 μ l	1ml

3. EdU标记与固定、通透

3.1 对于培养细胞

(1) 将适当数量的待测细胞接种于6孔板中，培养过夜至恢复正常状态后，进行所需要的药物处理或者其它刺激处理。

(2) 配制2XEdU工作液：用完全培养基稀释EdU(10mM)至合适的浓度，配成2X的EdU工作液。例如，推荐的EdU工作液(1X)的终浓度为 $10\mu\text{M}$ ，那么需要用完全培养基1:500稀释EdU(10mM)至浓度为 $20\mu\text{M}$ ，即配成2XEdU工作液($20\mu\text{M}$)。

【注】EdU的使用浓度应根据所使用的细胞类型做相应的优化，推荐用户以 $10\mu\text{M}$ 的EdU初始浓度进行摸索优化，一般的贴壁肿瘤细胞使用 $10\mu\text{M}$ 就可以。细胞培养基种类、细胞类型、细胞生长密度和增殖速度等多方面因素都有可能影响EdU的掺入效果，因此建议用户在预实验中设置一系列的EdU浓度梯度，以确定最佳浓度。如果之前使用过BrdU进行实验，则可以参考BrdU的终浓度作为EdU的终浓度。您也可以参考附表1.细胞实验EdU孵育浓度及时间参考。

(3) 37°C 预热2XEdU工作液，等体积加入6孔板中，使6孔板中的EdU终浓度变为1X。例如如果终浓度为 $10\mu\text{M}$ ，6孔板中每孔原来有培养基1ml，则将1ml 2XEdU工作液($20\mu\text{M}$)加入到每孔中。如果培养基原有体积过大，可以先吸除适量的培养基，再加入与剩下培养基等体积的2XEdU工作液；或者可以增加EdU的浓度并减少工作液的体积，例如2ml培养液中加入 $220\mu\text{l}$ 10XEdU工作液($100\mu\text{M}$)。

【注】更换所有的培养液可能会对细胞的增殖有影响，因此不建议更换所有的培养液。

(4) 继续孵育细胞适当时间。该孵育时间的长短取决于细胞生长速率，通常宜继续孵育细胞周期10%左右的时间。您也可以参考附表2.常见细胞系EdU孵育时间参考。

【注】孵育时间小于45min时，建议提高EdU的浓度；孵育时间大于20h时，建议适当降低EdU的浓度。

(5) EdU标记完成后，去除培养基，加入1ml 固定液，室温固定15-30min。

(6) 去除固定液，以每孔1ml的洗涤液洗涤细胞3次，每次3-5min。

(7) 去除洗涤液，加入1ml通透液，室温孵育10-15min。

(8) 去除通透液，以每孔1ml的洗涤液洗涤细胞1-2次，每次3-5min。

(9) 转步骤4。

3.2 对于组织切片样本

可以通过注射或进食等方式进行动物体内的EdU标记。以下是以小鼠为例的，其它动物体内EdU标记条件请参考相关文献，也可以参考附表3进行条件优化。

(1) 用PBS配制成一定浓度的EdU，对于小鼠，可按照10-200mg/kg的用量进行腹腔注射、特定组织或器官局部注射或者加入饮用水。

【注】 EdU具体用量与动物的种类、体重和使用方式有关，可以参考相关文献，因此建议用户在预实验中设置一系列的EdU浓度梯度，以确定最佳浓度。推荐用户以50mg/kg的EdU初始浓度进行摸索优化。如果之前使用过BrdU进行实验，则可以参考BrdU的终浓度作为EdU的终浓度。或者直接使用50mg/kg的浓度进行测试。也可以参考附表2。

(2) EdU标记4小时后或根据特定实验确定的适当时间后，快速处死小鼠，取出所需组织，按照常规步骤制作冰冻切片或石蜡切片。EdU标记的时间也根据相关参考文献自行调整。

(3) 对于冰冻切片：

- a. 加入适量固定液，室温固定15min。
- b. 去除固定液，用适量洗涤液洗涤3次，每次3-5min。
- c. 去除洗涤液，加入适量通透液，室温孵育10-15min。
- d. 去除通透液，用适量洗涤液洗涤1-2次，每次3-5min。
- e. 抗原修复(选做)：如果同时需要进行目的蛋白的免疫荧光染色，并有必要进行抗原修复，可以使用适当的抗原修复液(美仑货号：MB9895)进行抗原修复处理。
- f. 转步骤4。

(4) 对于石蜡切片：

- a. 脱蜡：二甲苯中脱蜡5-10min。换用新鲜的二甲苯，再脱蜡5-10min。无水乙醇5min，换新的无水乙醇3min。95%乙醇3min。85%乙醇3min。75%乙醇3min。50%乙醇3min。PBS 5min。
- b. 抗原修复(选做)：如果同时需要进行目的蛋白的免疫组化染色，可以使用适当的抗原修复液(美仑货号：MA0184、MA0188)进行抗原修复处理。

【注】 如果使用蛋白酶K或胰酶进行抗原修复，修复后须反复洗涤干净，避免残留的酶干扰后续标记反应。

- c. 转步骤4。

3. EdU检测

【注】本参考步骤每个样品的反应体系为500 μ l的Click反应液。用户可根据自己的样本情况参考表1适当调整。对于切片，可以根据切片大小，每个切片使用100-200 μ l的Click反应液，其余步骤相同。

(1) 配制Click-iT Additive Solution：对于MA0424，用1.3ml去离子水/管溶解Click-iT Additive；对于MA0424-L，用10.4ml去离子水/瓶溶解Click-iT Additive。混匀至全部溶解，即为Click-iT Additive Solution。配制后请按照每次用量适当分装，并-20 $^{\circ}$ C保存，溶液一旦呈现棕色，则说明有效成分降解不能再用。

(2) 请参考下表配制Click反应液。

【注】请严格按照下表中组分顺序和体积配制Click反应液，否则Click反应可能无法有效进行。Click反应液须在配制后15分钟内使用。

组分	以6孔板为例的样品数				
	1	2	5	10	50
Click-iT Reaction Buffer	430 μ l	860 μ l	2.15ml	4.3ml	21.5ml
CuSO ₄	20 μ l	40 μ l	100 μ l	200 μ l	1ml
488-Azide	1 μ l	2 μ l	5 μ l	10 μ l	50 μ l
Click-iT Additive Solution	50 μ l	100 μ l	250 μ l	500 μ l	2.5ml
总体积	500 μ l	1ml	2.5ml	5ml	25ml

- (3) 去除上一步骤中的洗涤液。每孔加入500 μ l Click反应液，轻轻摇晃培养板以确保Click反应液可以均匀覆盖样品。
- (4) 室温避光孵育30min。
- (5) 吸除Click反应液，以每孔1ml的洗涤液洗涤细胞3次，每次3-5min。
- (6) 此时增殖细胞被标记了明亮的绿色荧光。如无其它特殊要求，即可在荧光显微镜下观察，或者使用流式细胞仪、多功能酶标仪、高内涵筛选仪器(一般高内涵筛选需要细胞核复染)进行荧光检测分析。488-Azide的最大激发波长是491nm，最大发射波长是518nm。如果需要检测细胞增殖的比例，可以参照步骤5对细胞核进行复染。

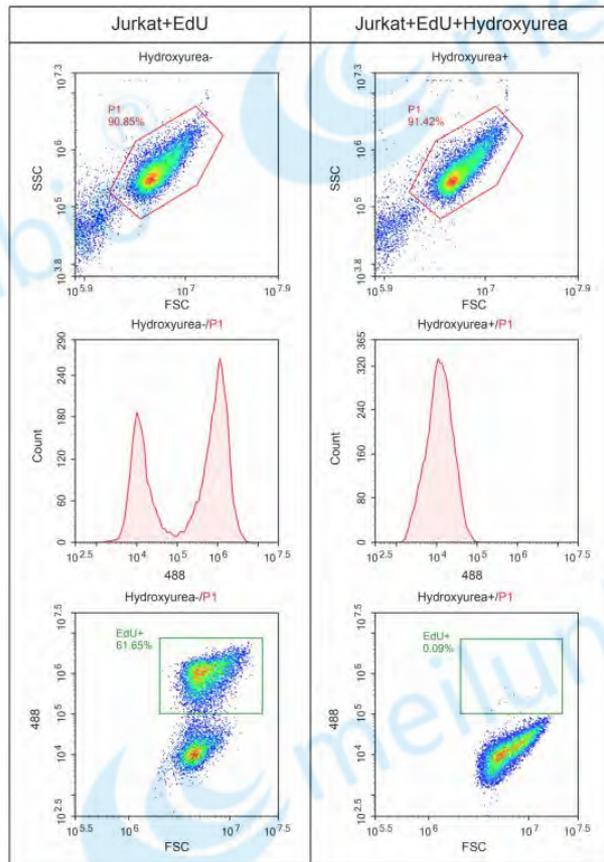
3. 细胞核染色

- (1) 1X Hoechst 33342溶液的配制：用PBS按1:1000比例稀释Hoechst 33342(1000X)。
- (2) 吸除步骤5(5)洗涤液，每孔加1ml的1X Hoechst 33342溶液，室温避光孵育10min。
- (3) 吸除1X Hoechst 33342溶液，以每孔1ml的洗涤液洗涤细胞3次，每次3-5min。
- (4) 随后即可进行荧光检测。Hoechst 33342为蓝色荧光，最大激发波长为346nm，最大发射波长为460nm。

结果:

图1. 检测Jurkat细胞增殖的流式结果图

Jurkat细胞只用EdU标记(左列), 或在标记EdU前30min用10mM的DNA合成抑制剂羟基脲(Hydroxyurea)处理(右列), 2小时后染色, 然后通过流式细胞仪进行检测。从流式结果图中可以看出, 仅EdU标记的细胞有较高比例的绿色荧光阳性细胞, 呈现绿色荧光阴性(弱染色)和阳性(强染色)的两个峰, 分别对应于未增殖细胞和增殖细胞。经过Hydroxyurea处理的细胞, 绿色荧光阳性的细胞几乎完全消失, 仅剩下一个绿色荧光阴性的峰。



结果:

图2. 检测HeLa细胞增殖的荧光显微镜图

HeLa细胞只用EdU标记(左列), 或在标记EdU前30min用10mM的DNA合成抑制剂羟基脲(Hydroxyurea)处理(右列), 2小时后染色(步骤最后染Hoechst, 方便观察增殖细胞比例), 然后通过荧光显微镜进行检测。镜下可见, 仅EdU标记的细胞有一部分染上绿色荧光的增殖细胞, 未增殖细胞的细胞核呈蓝色单染, 增殖细胞的细胞核呈绿色和蓝色双染; 经过Hydroxyurea处理的细胞, 几乎没有呈绿色荧光的增殖细胞, 绝大多数细胞核仅呈蓝色。

