

流式细胞仪在细胞生物学实验教学中的实践

张存新

浙江大学国家级生物实验教学示范中心 浙江 杭州 310058

[摘要] 根据细胞生物学实验课程的教学安排,将流式细胞仪实验技术融入实验课程,设计了小鼠脾脏细胞“Annexin V-APC/PI 荧光双染细胞凋亡检测”实验项目。采用流式细胞术检测双氧水对细胞凋亡的影响。双氧水浓度在 $100\text{ }\mu\text{M}$ - 100mM 之间,可以快速诱导产生小鼠脾脏细胞凋亡,随着浓度增大,凋亡比例也增加。实践表明,该实验项目的开设,使学生更好地理解 and 掌握流式细胞术的实验基本技能。

[关键词] 细胞生物学实验;细胞凋亡;实验教学;流式细胞术

[中图分类号] G641 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1647-9265 (2024) -0021-01 **[收稿日期]** 2023-12-06

1. 前言

21 世纪以来,以实验为基础的细胞生物学作为生物学的前沿学科,其实验课的教学内容十分重要。以浙江大学生科院为例,目前本科生开展的细胞生物学实验课程,仍以一些基本的实验操作为主,如显微镜的使用及细胞大小测量;密度梯度离心法分离提纯叶绿体及叶绿体荧光观察;差速离心法提取线粒体及线粒体的活体染色;细胞膜的渗透性;染色体标本制作;鬼笔环肽标记法观察细胞中微丝的分布;福尔根染色;激光共聚焦及扫描电子显微镜使用演示。这 8 个实验中至少急需更新 1 个实验。

流式细胞仪 (flow cytometer, FCM) 作为大型精密仪器,能对处在直线、快速、流动状态中的单个细胞或生物颗粒进行分析,目前已广泛应用于细胞生物学和临床检验等领域。目前多个高校在本科生中开设了流式相关实验^[1-8]。

生物实验中心细胞实验室今年得到浙江大学“双一流”经费仪器设备资助,已经

购买了一台分析型流式细胞仪 (Agilent NovoCyte 2060R),带 Novo Sampler 自动进样器。

国内流式细胞仪在本科实验教学中多采用体外培养细胞作为实验材料,但动物细胞的体外培养实验成本高,尤其培养血清价格昂贵。加上实验耗材和流式检测试剂盒的成本。目前《细胞生物学及实验》作为基础课每年超过 300 人选这门课,在本科学生人数多,班级多的基础课中开设这样的实验,将会大量占用其他实验项目的实验经费。为此,我们首次探索用小鼠脾脏淋巴细胞作为细胞凋亡实验材料,实验证明可以经双氧水快速诱导产生细胞凋亡现象。

在各种细胞凋亡检测方法中,以流式细胞术 Annexin V-APC/PI (或 Annexin V-FITC/PI) 双染法最常用。该方法可以将凋亡细胞和继发坏死的细胞分开,可以准确反映凋亡过程,可以作为检测细胞早起凋亡首选^[9-13],为研究者广泛应用。

氧化应激可以诱导细胞发生细胞凋亡

^[14-15]，我们设计小鼠脾脏细胞经双氧水诱导，“Annexin V-APC/PI 荧光双染，最后经流式细胞仪检测细胞凋亡的实验，可以让学生学到先进的实验技术，为以后研究生阶段的学习打下扎实的基础。

2. 实验教学设计

以含不同浓度的双氧水的无血清 DMEM 培养液培养体外分离的小鼠脾脏细胞为研究对象，用 Annexin V-APC/PI 荧光双染法检测细胞凋亡。出于实验时间考虑，诱导细胞凋亡时间选择为 0.5 小时以内。实验教学分理论教学和实验操作部分。理论部分讲述流式细胞仪相关知识，细胞凋亡检测原理，及注意事项等。实验操作涵盖了从细胞样本制备到上机检测及结果分析的所有步骤，培养了学生的基本实验操作技能，提高了学生分析问题的能力。

3. 实验方法

3.1 实验材料

3.1.1 实验动物

ICR 品系小鼠(3-4 周龄)。

3.1.2 主要试剂

红细胞裂解液(Elabscience 产品)。

凋亡试剂盒 Annexin V APC 和 PI (Elabscience 产品)。

3.2 样品制备方法

3.2.1 颈椎脱臼处死小鼠，取脾脏，用 1 ml 注射器在脾脏的一端刺几个小孔，注入 PBS 即可将细胞从脾脏吹出，反复几次，总体积 3 ml 可将部分脾细胞取出。

3.2.2 300 g 离心 5 分钟，去上清液，加入 5 ml 红细胞裂解液重悬细胞。静置 5 min，加入 5ml PBS 稀释后，300 g 离心 5 min，弃上清液，加 1 ml PBS 重悬细胞，取 100 μ L 在流式细胞仪上计数。计数其中 50 μ L 即可获得细胞浓度数据。

3.2.3 在 1.5 ml EP 管中加入含不同浓度双氧水的无血清培养液，同时需要设一管未用双氧水处理的作阴性对照。每管加入 5 万个细胞，轻柔涡旋混匀。细胞在 37 度培养 0.5 hr。

3.2.4 加入 Annexin V Binding Buffer 100 μ L，分别加入两个染液 2.5 μ L，轻柔涡旋混匀。冰上避光孵育 15-20min。加入 Annexin V Binding Buffer 400 μ L，混匀样本。立即上机检测，如不能及时检测，请于冰上避光静置并于 1 hr 内完成检测。

3.3 样品检测结果分析方法

在我们选择的仪器中，APC 和 PE 通道属于不同的激光管，所以不需要考虑荧光补偿问题。我们先分析未处理未染色样本，见图 1。

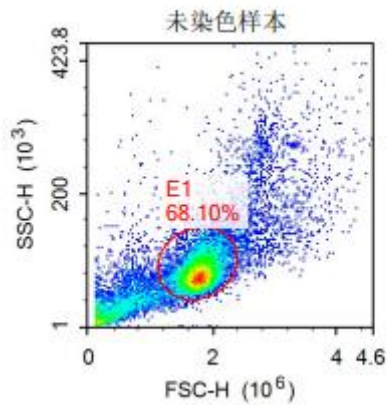


图 1 未染色样本的流式检测图

从细胞大小和密度角度观察，淋巴细胞模板应用于以下未处理和处理样本的凋亡分析集中在图中 E1 门中。我们把这门圈出，作为

我们再分析实验未处理阴性对照样品。见图 2.

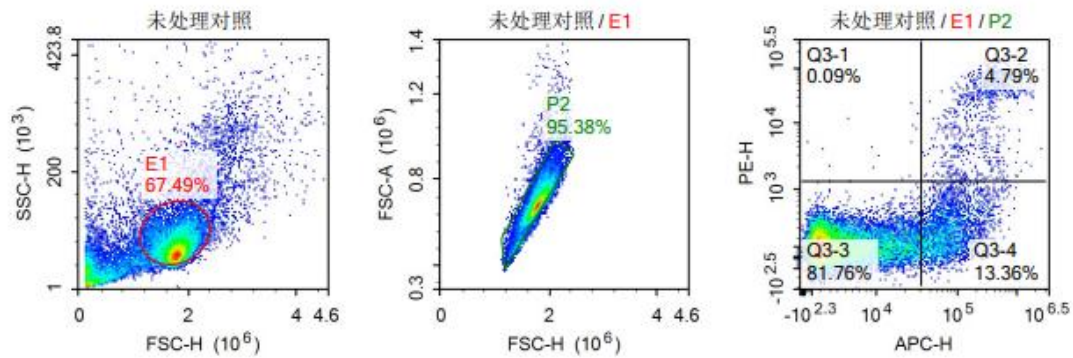


图 2 对照组细胞凋亡的流式检测图

线上，远离中心线的颗粒可能属于粘连体，

先把未染色样本的模板拉到样本分析中，将其排除；再在 P2 门中画十字门。

得到 E1 门；再建第 2 个门 P2，以 FSC-A 和

接着我们分析处理组样品。将模板拉

FSC-H 为坐标轴，单个细胞应该集中再一条

到实验组中。

见图 3，图 4，图 5，图 6.

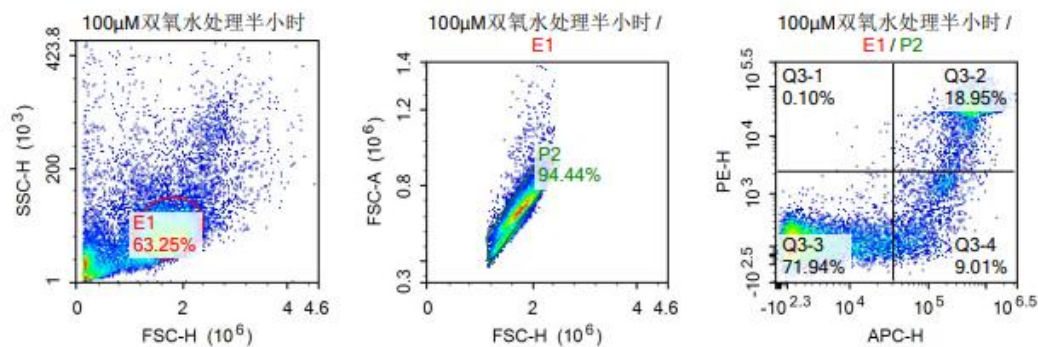


图 3 100 μ MH₂O₂, 0.5h 处理组细胞凋亡的流式检测图

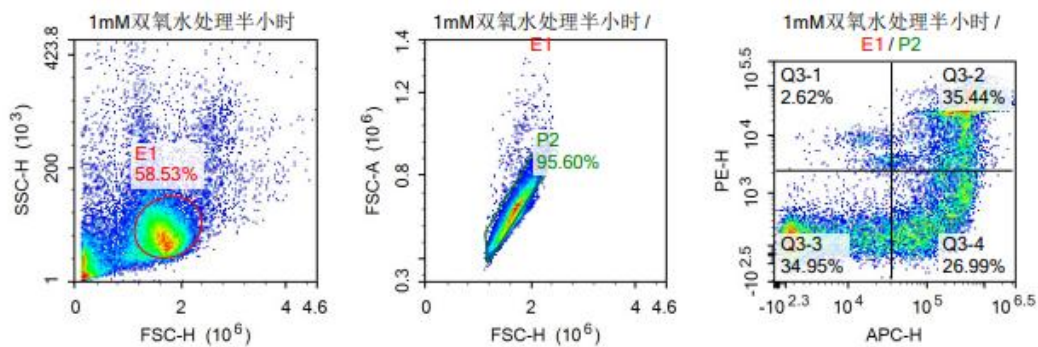


图 4 1mMH₂O₂0.5h 处理组细胞凋亡的流式检测图

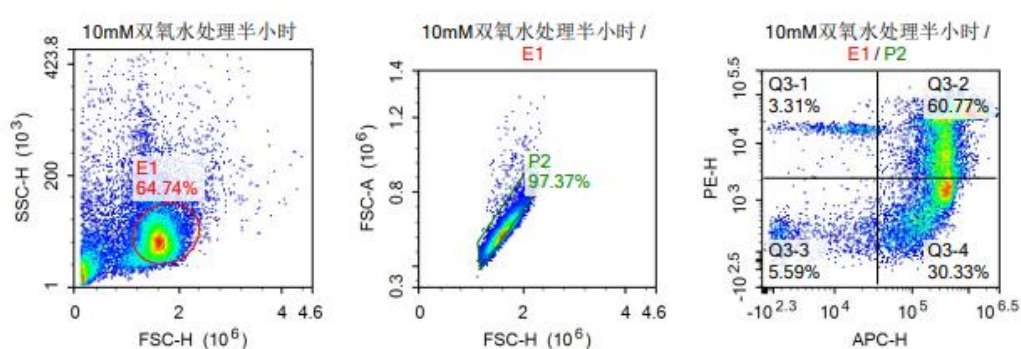


图 5 10mMH₂O₂0.5h 处理组细胞凋亡的流式检测图

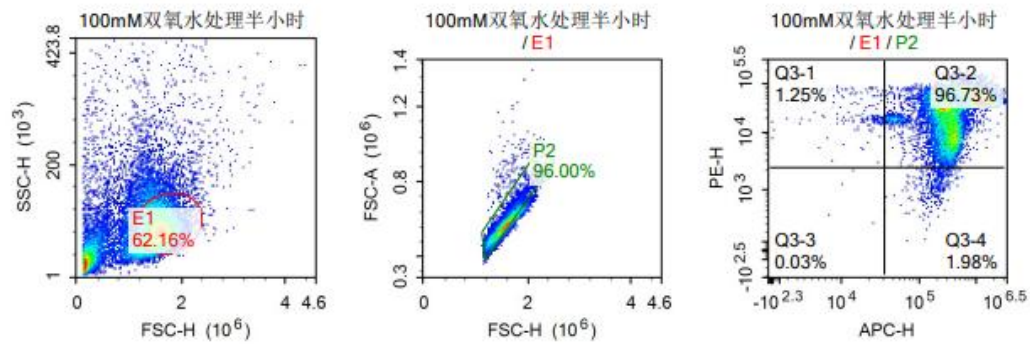


图6 100mMH₂O₂0.5h 处理组细胞凋亡的流式检测图

在 Q3-4 门内的细胞是 Annexin V-APC 阳性，而未被 PI 染色的细胞，属于早调细胞类型。在 Q3-2 门内的细胞是 Annexin V-APC 阳性，而被 PI 染色的细胞，属于晚调细胞类型。在 Q3-1 门内的细胞是死细胞，但不属于凋亡细胞。在 Q3-3 门内的细胞是活细胞，也不属于凋亡细胞。

4 实验结果

未处理组样品存在少量的细胞凋亡 (13.36%早凋亡和 4.79%晚凋亡)，当 100 μ MH₂O₂，0.5h 双氧水处理半小时后，出现了 9.01%的早凋亡和 18.95%的晚凋亡，双氧水浓度在 100 μ M -100mM 之间，可以明显诱导产生小鼠脾脏细胞凋亡，随着浓度增大，凋亡比例也增加（见图 3-6）。

5 结语

细胞凋亡如同细胞生长分化一样，是生命活动中重要的细胞学事件，其检测在科研实验室中应用广泛。然而由于细胞样品制备，人员，和仪器使用成本等局限，在细胞

生物学实验课程的教学过程中，往往难以建立适合在实验课有限实验时间内完成的实验方法。本文所述实验过程，可在 4 个学时内完成。由于学生人数多，样品数量多，检测时间长，为方便实验顺利开展，配备自动进样器是一种很好的解决方法。可以大大减轻技术人员的工作量，加快检测速度。采用双氧水快速诱导小鼠脾脏细胞凋亡，这个实验设计可以为其他高校相关课程中细胞凋亡实验内容的建立提供启发和借鉴。

基金项目：浙江省高校实验室工作研究，项目编号：YB202237 。

作者简介：张存新（1969-），男，汉族，浙江嵊州人，实验师，硕士，从事细胞生物学及流式细胞术相关技术研究。

参考文献：

[1] 吴艳，朱玲燕，邝栋明. 细胞生物学实验课程中两种细胞凋亡检测方法建立 [J]. 高校生物学教学研究 (电子版) 2022 年 2 月，12 (1) : 32-36.

- [2] 蒋海霞, 罗倩, 许杰. 流式细胞仪在本科生实验教学中的实践 [J]. 实验室研究与探索, 2021, 40 (10): 157-161.
- [3] 翟利芳, 展思辉, 王忠. 流式细胞仪在环境微生物学实验教学中的应用与实践 [J]. 实验室研究与探索, 2022 (4): 183-185.
- [4] 刘华, 张林西. 流式细胞仪在细胞生物学实验教学改革中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (11): 6958- 6959.
- [5] 吴安庆, 聂晶, 裴海龙. 流式细胞仪在放射生物学实验教学中的应用 [J]. 实验技术与管理, 2017 (1): 186-190.
- [6] 薛雅蓉, 庄重, 刘智慧. 设计利用现代科学仪器, 紧跟科学前沿的细胞生物学实验 [J]. 实验技术与管理, 2013 (6): 163-166.
- [7] 吴艳, 朱玲燕, 邝栋明. 细胞生物学实验课程中两种细胞凋亡检测方法的建立 [J]. 高校生物学教学研究 (电子版), 2022, 12 (1): 32-36.
- [8] 李卫红, 张海燕, 董凌月. 五年制基础医学专业荧光双染法分析细胞凋亡与细胞坏死的实验设计 [J]. 山西医科大学学报: 基础医学教育版, 2010, 12S2 (10): 74-75.
- [9] 田蜜, 徐晓雪, 邹林樾. 流式细胞术双标记法细胞凋亡检测方法的探讨 [J]. 包头医学, 2019 (4): 42-44.
- [10] 黄健, 沈永生, 周宏平. AnnexinV/PI、TdT 和 PI 法检测细胞凋亡的比较 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000 (4): 387-388.
- [11] 何雅军, 舒建昌, 吕霞. Annexin V FITC/PI 流式细胞术检测姜黄素诱导的肝星状细胞凋亡 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25 (1): 28-30.
- [12] 李欣, 路菊. 用 Annexin V FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡的体会 [J]. 检验医学, 2005, 20 (6): 598-599.
- [13] Vermes I, Hannen C, Steffens Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis flowcytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V [J]. T Immunol Methods, 1995. 184: 39-51.
- [14] 靳青, 张相伦, 魏晨. 氧化应激通过 Fas/FasL 信号通路调控奶牛子宫内膜细胞凋亡 [J]. 畜牧兽医学报, 2022 53 (6): 1819-1828.
- [15] 陈龙菊, 吴建清, 吴太鼎. 保护双氧水诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34 (3): 343-347.

Practice of Flow cytometry in the Experimental Teaching of Cell Biology

Zhang Cunxin

National Biological Experimental Teaching Demonstration Center, Zhejiang
University, Hangzhou 310058, China

Abstract: According to the teaching arrangement of the Cell Biology experiment course, the flow cytometry experiment technology is integrated into the experiment course. An experiment of “the apoptosis of splenic cells in mice was detected by Annexin V-APC/PI double staining flow cytometry” is designed. The effect of H₂O₂ on apoptosis of spleen cells was detected by flow cytometry. When the concentration of H₂O₂ was between 100 μM and 100 mM, the apoptosis of mouse spleen cells was induced rapidly, and the proportion of apoptosis increased with the concentration of H₂O₂. Practice shows that the experimental course enables students to better understand and master the experimental basic skills of flow cytometry.

Key words: cell biology experiment; Apoptosis; experimental teaching; flow cytometry