

懸浮性細胞或培養的細胞

此法利用酒精將細胞固定，是相當受歡迎的分析方法。除了固定細胞，酒精的另一功用為增加細胞膜通透性，使 propidium iodide 染料能進入細胞及核膜內，形成 DNA 特異性染色。經酒精固定的細胞相當穩定，樣品可在低溫下至少保存一個月，而不會影響染色結果，故此法適用於 Time-Course 與 Dose-Response 等實驗設計，研究者可在不同時間點收取細胞，經固定處理後即低溫儲存，然後在完成所有時間點的檢品收取後，再一齊進行所有檢品染色與分析工作，除了方便工作時間的配合，可避免 date-to-date 變異性。

實驗器械和試劑：

Ethanol, 70% acetone-free, 30% ddH₂O.

PBS (phosphate-buffered saline)

0.23 g NaH₂PO₄ (anhydrous, 1.9 mM)

1.15 g Na₂HPO₄ (anhydrous, 8.1 mM)

9.00 g NaCl (154 mM)

Add H₂O to 900 ml. If needed, adjust to desired pH (usually 7.2 to 7.4). Add H₂O to 1 liter. Filter sterilized, and stored at 4°C.

Ribonuclease 儲存液, 2 mg/ml

Combine 10 mg RNase A (Sigma Catalog No. R9005) and 5 mL PBS in a 15 mL tube. Heat to 75 °C for 20 minutes; cool to room temperature. Store in 1 mL aliquots frozen in microcentrifuge tubes for up to 6 months.

Triton X-100 儲存液, 5% (Sigma Catalog No. T6878) 5% in PBS.

Propidium iodide 儲存液, 1mg/ml

A stock solution of PI, made by dissolving 1 mg PI in 1 ml water, can be stored several months at 4°C. Stir gently to dissolve completely. Protect from light. Store at 4°C.

PI/Triton X-100 DNA 染色液 Combine 0.2 ml of 1 mg/ml propidium iodide, 0.2 mL of 5% Triton X-100, and 1.0 ml of 2 mg/ml of RNase A in 8.6 mL PBS (final volume 10ml). Stir gently to mix completely. Protect from light and store at 4 °C.

實驗步驟：

1. 先將 PBS、酒精、及樣品放在冰桶中冷卻。
2. 製備單細胞懸浮液。若為貼壁生長細胞株，先以 PBS 清洗，再 Trypsin Versene 酵素處理以釋放細胞，切記不可過度作用，待細胞變圓，便以 5 ml 含血清 (5%FCS) 之培養液收取細胞，並均勻地打散細胞懸浮液。調整細胞濃度，大約成 2×10^6 cells/ml。
3. 取樣 1 ml 細胞懸浮液，加入 5 ml 冰冷 PBS 來清洗細胞。低速離心 5 分鐘，並小心地去除上清液，可留約 50 ul 溶液，避免碰及細胞。
4. 加入 0.2 ml 冰冷 PBS，並均勻地打散細胞。
5. 一邊振盪混合細胞懸浮液，同時一滴一滴地加入 3 ml 預冷的 70% 酒精以固定細胞，靜置在 -20°C 冰箱中至少一小時（酒精固定後樣品可靜置過夜）。
6. 低速離心 5 分鐘 $300 \times g$ ，吸除上清液，可留約 50 ul 溶液，避免碰及細胞。
7. 將細胞團塊均勻地打散，加入 5 ml PBS 來清洗細胞。靜置一分鐘後低速離心 5 分鐘 $300 \times g$ ，儘量吸除上清液。
8. 加入 1.0 ml PI/ Triton X-100 染色液，將細胞團塊均勻地打散，並輕搖混合，在室溫下暗室中作用 30 分鐘（終濃度為 Triton-X 0.1%，RNase A 0.2 mg/ml, & PI 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，請避免重覆使用回溫過之酵素）。
9. 記得臨上機前混勻樣品，並以 35- μm 尼龍篩網過濾樣品。必須在兩小時內上機分析，如不馬上分析樣品，請包以鋁箔紙，儲放在 4°C 的冰箱中。測前向側向散色光和紅色螢光 (用 FL2-A)。

注意事項：

1. 使用回溫多次之 RNase，或用量不足將會照造成 G0/G1峰 CV 值較高，影響數據分析之解析度。
2. PI 染色結果與細胞濃度、染料濃度息息相關，務求樣品間之一致性，方可互相比較。最終樣品中的細胞濃度應維持在每毫升 1×10^6 細胞 ($\pm 20\%$)。如樣品中細胞濃度差異過大，可增減使用的 PI 染色液體積以調整細胞濃度。
3. 最終樣品中的 PI 染色劑濃度也應維持恆定，例如每毫升 20 μg PI，所以調整細胞濃度時切忌使用 PBS 緩衝液，因會導致 PI 濃度下降，影響染色效果。如添加 PI 染色液以調整細胞濃度的檢品，須靜置約十五分鐘，待 PI 染色達到新平衡才可上機分析。
4. 單一細胞核之圈選：以 MODFIT 分析直方圖時，需注意去除因雙連體造成之雜訊。如圖例中，先在 FL2-W vs FL2-A 二維點圖上進行單一細胞之圈選（見下頁例圖）。

5. 去除細胞團塊：偶爾會發現以乙醇固定後，細胞會出現嚴重的粘附現象。這可能時由死亡細胞的 DNA 在固定之前的外漏引起的。用光學顯微鏡檢查樣品，如有輕度的粘附，可以用 25 號針頭抽吸樣品數次，以打散細胞。中等程度的粘附，可以通過過濾網來去除。也可考慮在固定之前將細胞懸浮于含有 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase 的培養基中（例如，RPMI）37°C，作用 10 分鐘。
6. 去除細胞碎片：如有很多細胞碎片，可在乾淨試管內預加 1 ml 小牛血清，再將細胞團塊均勻地打散，並輕輕地加到小牛血清上面，低速離心 3 分鐘，去除上清液，再以棉花棒擦除黏在管壁上細胞碎片。之後再加入 5 ml 冰冷 PBS 來清洗細胞便可進行 DNA 染色。
7. BD LSR 用戶可用 UV 激發 DNA 染料。終濃度為 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 (FL4-W), or 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI (LSR, FL5-W)。

參考文獻:

1. Braylan RC, et al. Correlated Analysis of Cellular DNA Membrane Antigens and Light Scatter of Human Lymphoid Cells. Cytometry. 1982;2:337-343.
2. Krishan A. Rapid Flow Cytometric Analysis of Mammalian Cell Cycle by Propidium Iodide Staining. J Cell Biol. 1975;66:188-193.
3. Dietch AD, Law H, White RD. A Stable Propidium Iodide Staining Procedure for Flow Cytometry. J Histochem and Cytochem. 1982;30:967-972.

