

实验报告书

项目名称：流式细胞仪检测 A172 细胞凋亡的实验报告

客户姓名：

合同号：

项目负责人：

一、 实验仪器与试剂

表格一：实验仪器

仪器	厂家	型号
细胞培养箱	Thermo Scientific	HERA cell CO ₂
低温高速离心机	64R	BECKMAN
流式细胞仪	BD	FACS Calibur

表格二：试剂

试剂	厂家
DMEM 培养液	Hyclone
胎牛血清	Gibco
无钙、镁 PBS 7.4 (0.1 M)	自配
Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒	BD

二、 实验步骤

1. 细胞培养

取对数生长期的 A172 细胞，按 1×10^5 个/mL 以 1mL 体积接种于 6 孔板内。
无抗生素培养液培养过夜，到转染时使细胞达到 70% 的汇合率。

2. 转染

- 1) 将 12.5uL siRNA 溶于 387.5uL 无血清的 DMEM 中，混合均匀。
- 2) 将 12.5uL Lipofectamine 2000 溶于 387.5uL 无血清的 DMEM 中，混合均匀。在室温下孵育 5 分钟。
- 3) 将上述两种混合物混合（总体积 800uL），轻轻混合均匀在室温下孵育 20 分钟形成复合物。
- 4) 在 6 孔板中每孔加入 800uL 复合物。十字法混合均匀。
- 5) 细胞在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 6h 后弃上清液，并加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。

3. 染色

消化并离心收集细胞（1000rpm/min）后弃上清，加入无钙、镁 PBS 1mL 洗 2 次，离心后弃上清。分别加入 100μL binding buffer、5μL Annexin V-FITC 和 5μL PI 溶液，室温避光孵育 15min。

4. 检测

上海秉新生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区龙吴路 2715 号 2A 楼 110 室

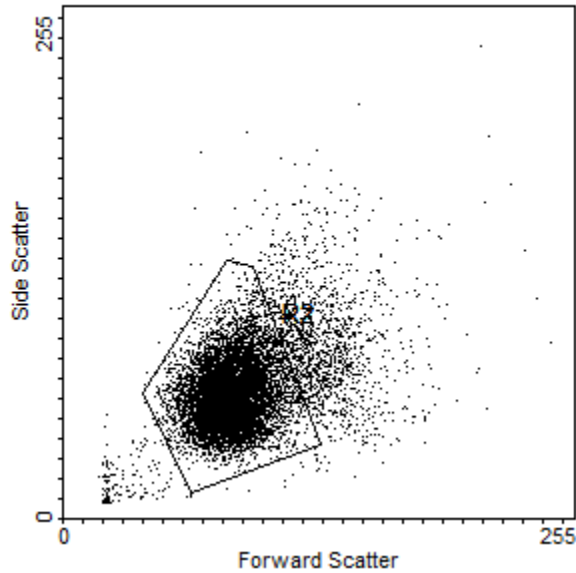
电话：021-54438753

网址：www.bio-nano.com.cn

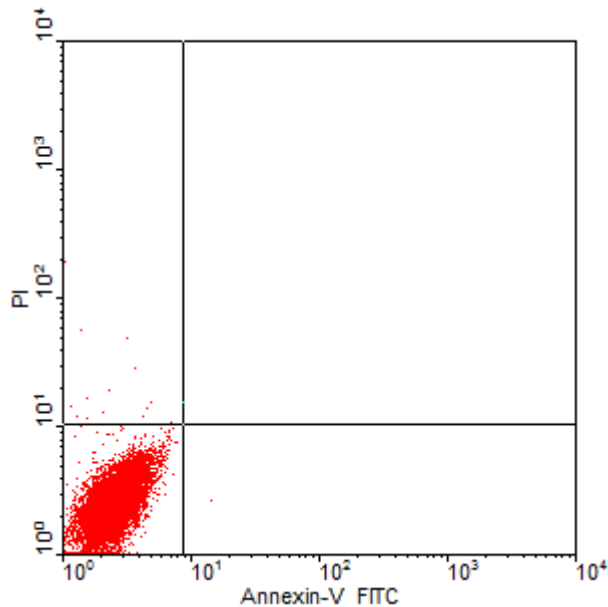
邮箱：service@bio-nano.com.cn

加入 400 μ L binding buffer 后以标准程序用流式细胞仪检测，汞激发波长 488nm，计数 1 万个细胞。

三、 实验结果



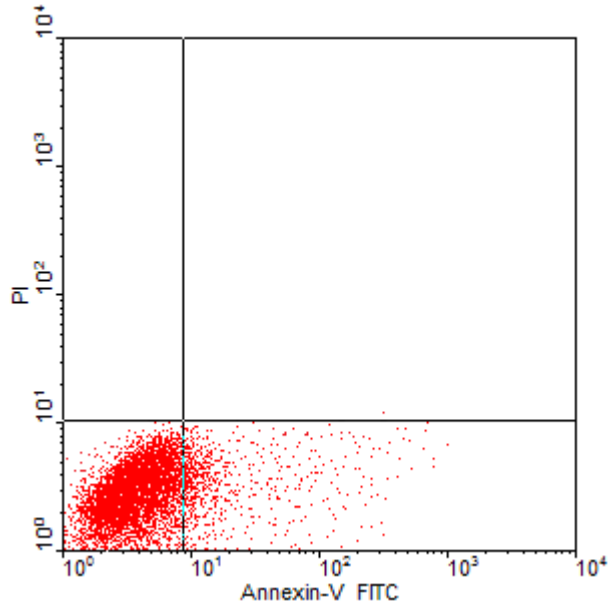
对照



Quad	Events	%Total	%Gated
1 UL	14	0.14	0.17

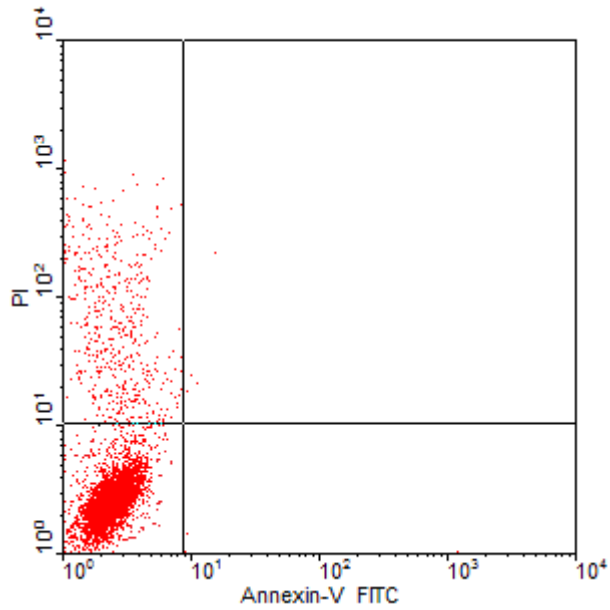
2 UR	1	0.01	0.01
3 LL	8402	84.02	99.81
4 LR	1	0.01	0.01

Annexin-V 对照



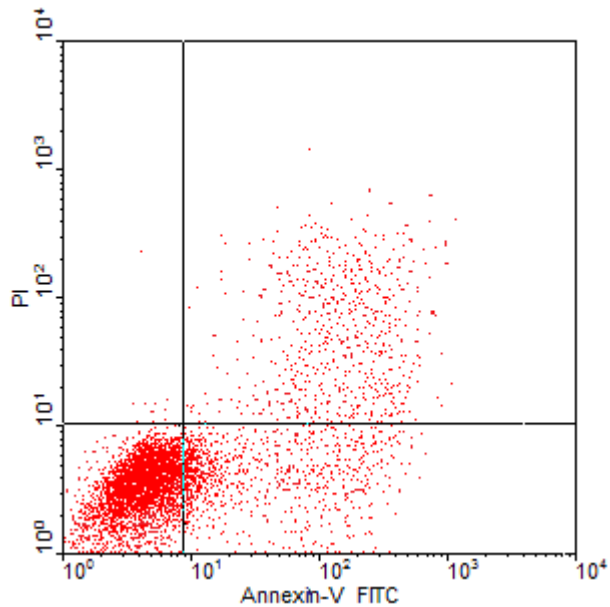
Quad	Events	%Total	%Gated
1 UL	0	0.00	0.00
2 UR	3	0.01	0.01
3 LL	7510	75.10	86.81
4 LR	809	8.09	13.18

PI 对照



Quad	Events	%Total	%Gated
1 UL	693	6.93	12.41
2 UR	7	0.07	0.08
3 LL	7777	77.77	87.49
4 LR	1	0.01	0.02

实验 siRNA 组



Quad	Events	%Total	%Gated
1 UL	11	0.11	0.15
2 UR	1075	10.75	17.54

上海秉新生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区龙吴路 2715 号 2A 楼 110 室

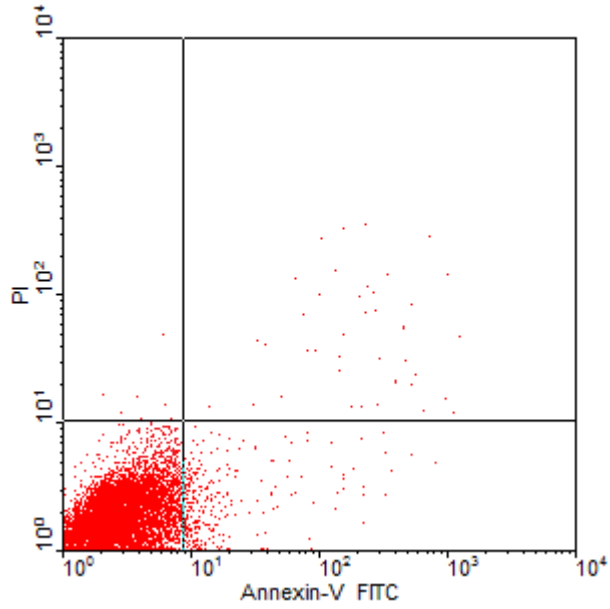
电话：021-54438753

网址：www.bio-nano.com.cn

邮箱：service@bio-nano.com.cn

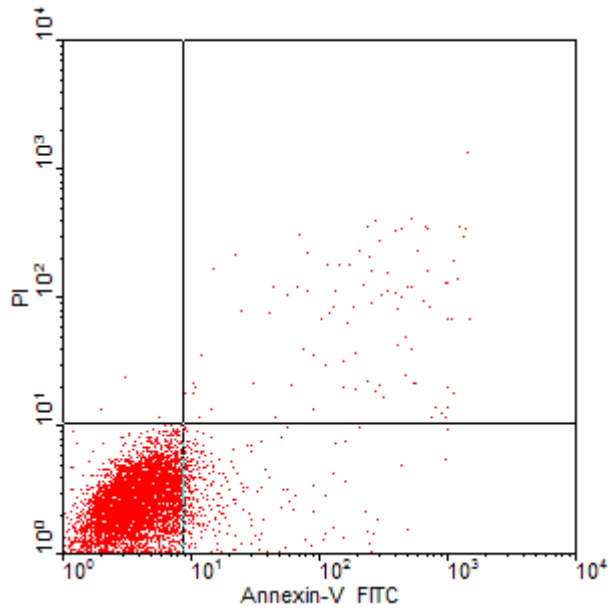
3 LL	5759	57.59	67.47
4 LR	938	9.38	14.84

阴性 siRNA 组



Quad	Events	%Total	%Gated
1 UL	7	0.07	0.09
2 UR	108	1.08	1.43
3 LL	8088	80.88	94.33
4 LR	255	2.55	4.15

转染试剂组



Quad	Events	%Total	%Gated
1 UL	4	0.04	0.06
2 UR	129	1.29	1.58
3 LL	8023	80.23	95.69
4 LR	188	1.88	2.67