

ACEA NovoCyte 流式细胞仪应用资料

—微核分析



■ 概述

微核 (micronucleus, 简称 MCN) 是真核生物细胞中的一种异常结构, 是由有丝分裂后期丧失着丝粒的染色体片断游离于细胞质中产生的。细胞受遗传毒物作用形成微核, 以检测细胞中微核的形成来检测物质遗传毒性的试验称为微核试验。目前, 微核试验已被许多国家及机构纳入标准检测试验, 用于评价新药、食品添加剂、农药、化妆品、工业化学品、环境污染物等遗传毒性的检测、安全性评价和遗传损害的检测。体外流式微核分析, 让该过程变得更加简单、快捷、可靠, 并可获得更丰富的信息。

流式细胞术是检测微核的新兴技术平台。相比于传统的显微镜下计数微核的方法, 流式细胞技术的检测优势在于: 高速高通量, 多细胞多参数, 高特异性, 多信息。

ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪的免调增益电压、超强信号检测、直接体积法绝对计数等特点在微核检测上凸显其检测及分析优势。ACEA NovoCyte 流式细胞仪结合 In Vitro MicroFlow 试剂盒 (BD, Cat# 562354) 进行微核分析。ACEA NovoCyte 流式细胞仪通过采集分析 EMA (Ethidium monoazide, 只进入膜通透的凋亡、坏死细胞对染色体染色; BL4 通道) 阴性的细胞核和微核的数量, 及它们的 SYTOX Green (标记所有细胞核和微核; BL1 通道) 荧光强度分布, 获取微核比例、细胞存活率 (处理组与对照组 Nuclei-to-Beads 的比值) 和细胞周期信息。本实验用长春碱 (Vinblastine) 处理对数生长期 CHO-K1 细胞 (中国仓鼠卵巢细胞), 诱导微核产生并在 ACEA NovoCyte 流式细胞仪上检测及分析。

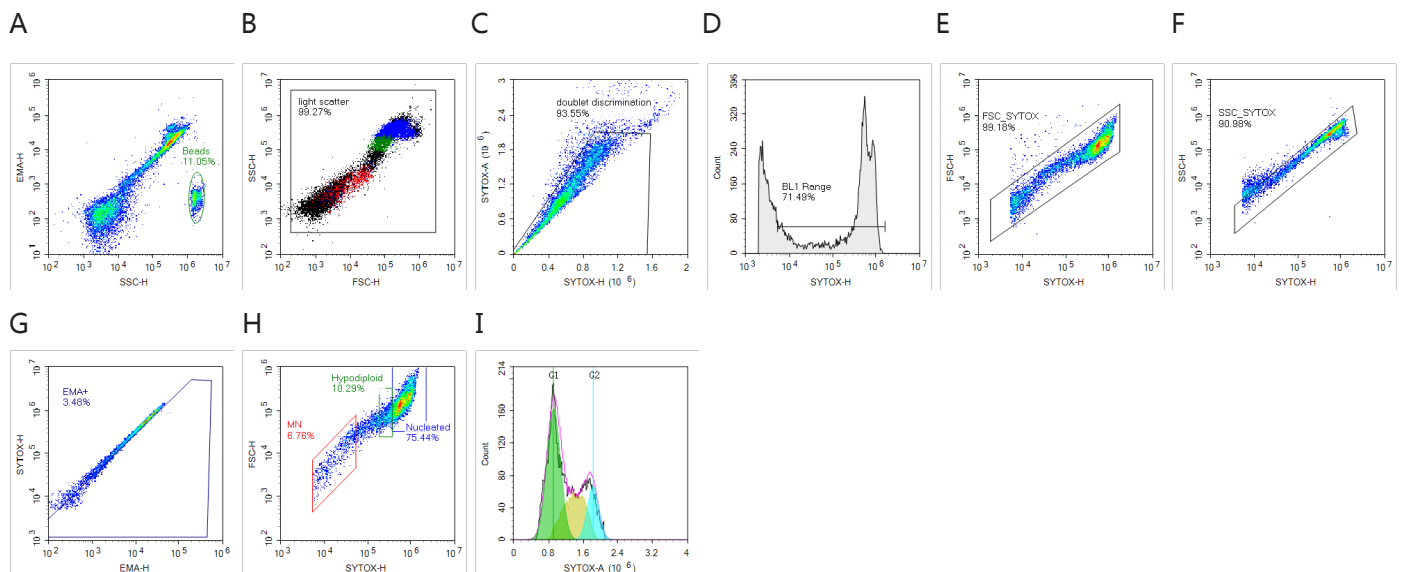
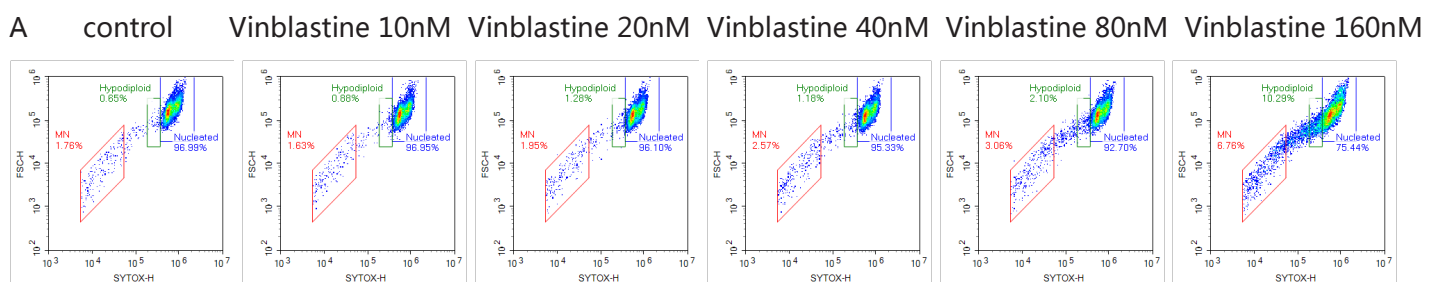
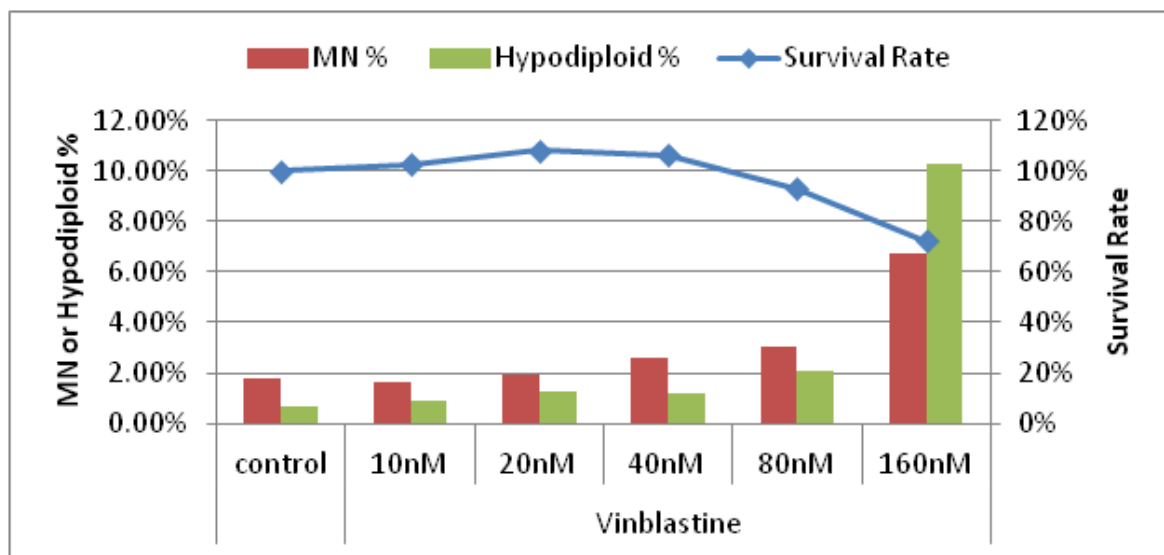


图 1. NovoCyte 流式检测 CHO-K1 细胞在长春碱作用下的微核生成。160nM 长春碱处理 CHO-K1 细胞 24 小时, 样品在 NovoCyte 流式细胞仪上进行采集及微核分析。从 A-I 逐级设门: (A) Beads 门圈出细胞计数参照微球, 用于 Nuclei-to-Bead Ratio 的计算; (B) 在不包含 Beads 的 FSC/SSC 散点图上设门, 散点图蓝色为 H 图 Nucleated 门完整细胞核, 红色为 H 图 MN 门微核, 绿色为 H 图 Hypodiploid 门亚二倍体; (C) 排除粘连体; (D) BL1 Range 门包含细胞核和亚二倍体染色体 (SYTOX 荧光强度至少为 2n 染色体的 1/100); (E) 大部分死细胞染色体在 FSC_SYTOX 门之外; (F) 大部分死细胞染色体在 SSC_SYTOX 门之外; (G) 用于排除 EMA+ 的凋亡/坏死细胞; (H) 只有经过上述层层设门的细胞核和微核才用于计算微核比例, Nucleated 门为完整的细胞核, MN 门为微核, 160nM 长春碱处理 CHO-K1 细胞 24 小时后的微核比例为 6.76% (溶剂处理对照微核比例 1.76%, 此处未展示详细图形); (I) Nucleated 门完整细胞核的细胞周期分析, 长春碱处理对细胞周期未产生明显影响。





A control Vinblastine 10nM Vinblastine 20nM Vinblastine 40nM Vinblastine 80nM Vinblastine 160nM

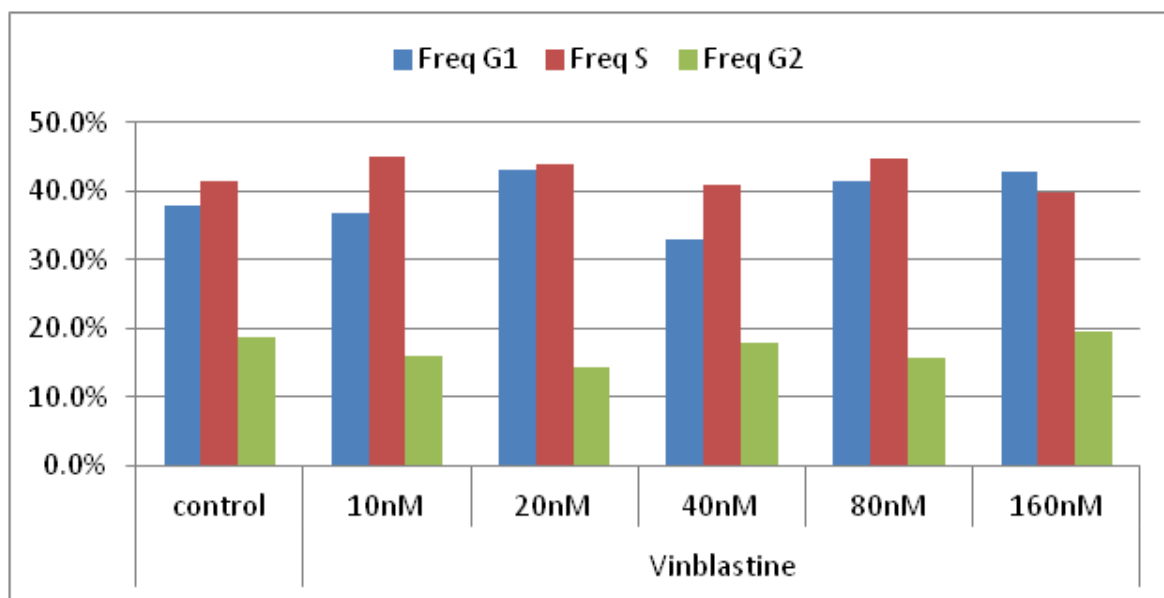
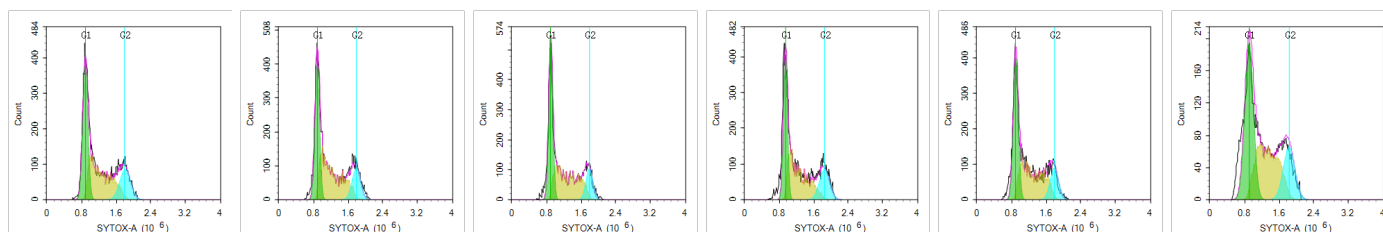


图 2. CHO-K1 细胞在长春碱作用下的微核形成呈药物浓度依赖的趋势。不同浓度长春碱处理 CHO-K1 细胞 24 小时后的微核比例、亚二倍体比例、细胞存活率分析 (A) 及细胞周期分析 (B)。长春碱作用于 CHO-K1 细胞, 明显导致 CHO-K1 细胞产生微核和亚二倍体, 且微核比例及亚二倍体比例随药物浓度升高而增加, 细胞存活率随药物浓度升高而降低。长春碱处理对细胞周期未产生明显影响。

