

染色体甩片 Chromosome Spreading

染色体甩片是通过低渗溶液将细胞膜破裂后, 将分裂期细胞染色体分散开的一种实验手段, 便于计数和观察。本Protocol改自楼慧强课题组, 将染色体的观察手段更改为荧光显微镜

1. 提前配置低渗溶液(0.075 M KCl), 可以从3M KCl中稀释(40x), 0.1mL 3M KCl + 3.9 mL 超纯水, 4°C冰箱保存
2. 提前配置固定液, 1mL冰醋酸+3mL冰甲醇, 每个样品配制3管, -20°C保存
3. 提前准备22 mm/24 mm玻片, 泡酸、清洗并4°C充分预冷
4. 双Thy同步化10 cm皿的细胞

! 实验开始前, 提前遇冷大4°C离心机

5. 将同步化后的分裂期细胞胰酶消化到15 mL管中, 1000 rpm 5 min 4°C离心富集细胞, 去上清
6. 用3mL预冷的PBS涮洗细胞1次, 洗去培养基、Nocodazole等药物, 1000 rpm 5 min 4°C去上清
7. 低渗处理, 加入3 mL 0.075 M KCl重悬细胞, 冰上静置5 min, 1000 rpm离心3 min, 去上清
8. 加入3 mL 固定液重悬, 静置10 min, 1500 rpm离心5 min
9. 再次重复固定步骤2次, 总共固定3次(每次固定后, 可适当增加离心时间, 可以采用5、6、7 min)
10. 最后一次离心后, 去除大部分上清, 留下约300-400 μ L固定液, 重悬细胞, 混匀
11. 吸取几滴细胞固定液, 从高处滴在经过处理的、预冷的、干净玻片上散开, 或点在玻片上后立刻吹散到整个玻片
12. 放置于滤纸上, 静置, 等待干燥后, 即可进行染色
 - 免疫荧光: 直接将玻片扣在BSA配制的抗体稀释液滴上
 - 使用PBS 1:10000稀释的DAPI染液, 室温孵育10分钟
 - 正常在孔板中使用3次5分钟PBS洗去非特异性结合
13. Mowiol, 指甲油封片, 荧光显微镜镜检

修订日期 2023-10-08