



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

YO-PRO-1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
R32594-100T	YO-PRO-1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒	100T
R32594-500T	YO-PRO-1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒	500T

产品简介:

源叶生产的 YO-PRO- 1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒(Apoptosis and Necrosis Detection Kit with YO-PRO- 1and PI), 简称 YP1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒, 是一种基于 DNA 绿色荧光染料 YO-PRO- 1(YP1)和红色荧光染料碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)的双荧光法检测细胞凋亡和坏死的试剂盒。本试剂盒适用于荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪及其它荧光检测系统。

YO-PRO- 1, 又名恶唑黄(Oxazole yellow), 简称 YP1, 是一种对正常动物细胞膜没有通透性而对于凋亡细胞的细胞膜有通透性的 DNA 绿色荧光染料, 常用于细胞凋亡的检测。YO-PRO- 1 是一种非细胞膜穿透性的并对 DNA 具有高亲和力的羰花青单体绿色荧光染料, 在没有与 DNA 结合的时候基本上没有荧光, 而与 DNA 结合后可以发出明亮的绿色荧光。在细胞凋亡发生时, 细胞膜通透性发生改变, 此时 YO-PRO- 1 可以进入细胞内与 DNA 结合, 发出明亮的绿色荧光, 因此常使用本荧光染料用于分析和鉴定凋亡细胞。需要注意的是 YO-PRO- 1 也能染色坏死细胞, 因此需要和对坏死细胞特异性荧光染色的 PI 进行双染才能有效判定细胞凋亡。

PI, 即碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸红色荧光染料, 只能染色细胞膜完整性丧失的坏死细胞, 并与核酸结合发出明亮的红色荧光。因此, YO-PRO- 1 与碘化丙啶(PI)联合使用, 可以同时进行凋亡细胞和坏死细胞的检测, 凋亡细胞呈现绿色荧光, 坏死细胞同时呈现红色和绿色荧光阳性, 活细胞很少或几乎没有荧光。

细胞死亡包括凋亡(apoptosis)、坏死(necrosis)、焦亡(pyroptosis)等多种形式。其中受调控的细胞死亡被称为程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)。程序性细胞死亡包括凋亡、细胞程序性坏死(programmed necrosis)或坏死性凋亡(necroptosis)和焦亡等。从细胞膜的完整性角度来看, 凋亡的特征是细胞膜的完整性会保留,

而坏死的特征是细胞膜的完整性会丧失。

细胞凋亡是生物体发育等生命过程中普遍存在的、由基因决定的细胞主动有序的死亡方式。当细胞遇到内、外环境因子刺激时,启动基因调控的自杀保护措施,去除体内非必需细胞或即将发生特化的细胞。在这一过程中,细胞脱落离体或裂解为若干凋亡小体,并迅速被巨噬细胞或邻近细胞清除,不会导致炎症反应,这是一种由基因控制、高度有序的细胞自主死亡,包含一系列信号事件组成的通路。细胞凋亡的主要特征包括细胞膜保持完整、细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻(Annexin V 染色阳性)、基因组 DNA 片段化(DNA fragmentation)(即产生 DNA ladder 并且 TUNEL 染色阳性)、电镜或荧光染色时细胞核碎裂或致密浓染、Caspase 3 等激活、线粒体膜电位下降、细胞色素 C 从线粒体内释放等。

坏死通常被认为是一种偶发性的并且是被动的细胞死亡,如物理性或化学性的损害因素及缺氧与营养不良等都可以导致细胞坏死。坏死细胞初期细胞膜通透性增高,致使细胞肿胀,细胞器变形或肿大,早期细胞核无明显形态学变化,最后细胞破裂,细胞膜丧失完整性,释放出细胞内容物,并常引起炎症反应,但不会出现细胞凋亡或自噬标志物。通常,凋亡对生命体是有利的,而坏死很可能是有害甚至是致命的。凋亡的晚期也可以发生继发性坏死(secondary necrosis)。受细胞程序性调控的坏死(programmed necrosis)被称为 necroptosis。

YO-PRO-1 与 DNA 结合后的最大激发光波长为 491nm,最大发射波长为 509nm;PI 与 DNA 结合后的最大激发光波长为 535nm,最大发射光波长为 617nm。YO-PRO-1、PI 与 DNA 结合后的激发光谱和发射光谱参考图 1。

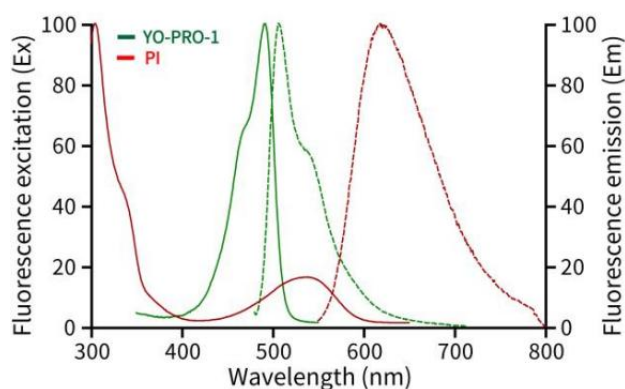


图 1. YO-PRO-1、PI 与 DNA 结合后的激发光谱和发射光谱。

本试剂盒作为一种细胞凋亡和坏死检测试剂盒，可以应用于大多数的哺乳动物细胞，包括贴壁细胞和悬浮细胞，与传统的 Annexin V-FITC/PI 检测方法相比，检测准确性和灵敏度相当。本试剂盒用于检测细胞凋亡与细胞坏死的效果参考图 2。

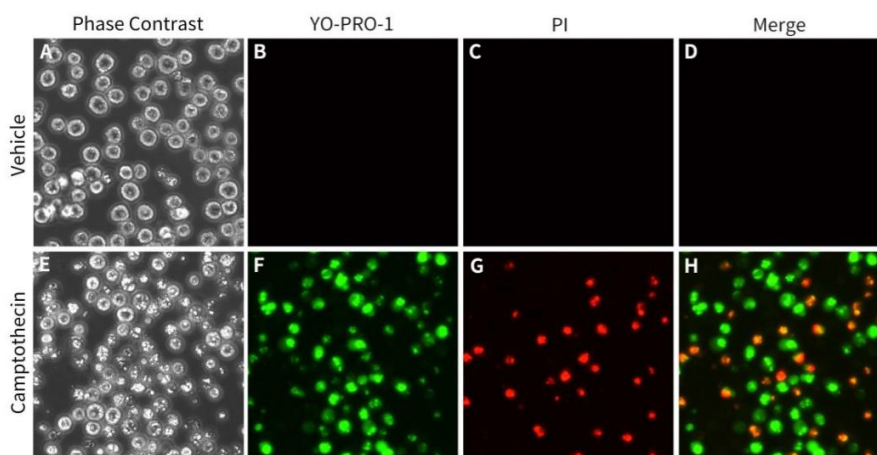


图 2. YO-PRO- 1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒检测 MOLM13 (人急性髓原白血病细胞)细胞凋亡与坏死的效果。正常状态的 MOLM13 细胞在明场下的形态见图 A；正常细胞不会被 YO-PRO- 1 以及 PI 染色(图 B-D)。50 μ M Camptothecin 诱导 7 小时后的 MOLM13 细胞在明场下的形态见图 E；此时细胞产生明显的凋亡，凋亡细胞的细胞核被 YO-PRO- 1 染色为绿色荧光(图 F)；坏死细胞的细胞核则同时被 YO-PRO- 1 和 PI 染色，红色荧光和绿色荧光重叠呈现橙黄色 (图 G)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异，本图仅供参考。

本试剂盒提供的 YO-PRO- 1 和 PI 为 1000X 溶液，使用非常便捷。为了得到比较理想的染色结果，请根据细胞类型和实验实际情况对探针染色液的稀释倍数进行适当调整。YO-PRO- 1 的工作浓度一般为 0.5-5X，推荐使用浓度为 1X；PI 的工作浓度为 0.1-4X，推荐使用浓度为 1X。同时，本试剂盒配套提供的检测缓冲液可在一段时间内维持细胞的正常状态，并给细胞提供一定的营养，效果通常比 PBS 或 HBSS 更好。

本试剂盒小包装和中包装用于流式细胞仪，每个样品使用 0.5ml 的检测工作液，可以分别进行 100 次和 500 次检测；用于 96 孔板每孔检测体系的体积为 100 μ l 时可以分别可以检测 500 次和 2500 次，检测体系体积为 200 μ l 时可以分别可以



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

检测 250 次和 1250 次。实际检测次数会因为检测体系的大小和所使用底物浓度的高低而有所不同。

产品组成:

产品编号	产品名称	包装
R32594-100T	YP1 (1000X)	50 μ l
	PI (1000X)	50 μ l
	检测缓冲液	50ml
—	说明书	1 份

产品编号	产品名称	包装
R32594-500T	YP1 (1000X)	250 μ l
	PI (1000X)	250 μ l
	检测缓冲液	250ml
—	说明书	1 份

保存条件:

-20°C, 一年有效。

注意事项:

荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。

检测缓冲液应在无菌环境中使用, 否则可能会被微生物污染而影响使用效果, 甚至无法继续使用。

两种荧光探针首次使用时, 可以适当分装后在-20°C 避光保存, 适当避免反复冻融。

YP1 和 PI 对人体有刺激性, 操作时请小心, 并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。

本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. YP1/PI 检测工作液准备:



a. YP1/PI 检测工作液的用量: 对于 6、12、24、96 孔板, 每孔 YP1/PI 检测工作液的用量分别为 0.5~1ml、200~500 μ l、100~200 μ l 和 50~100 μ l; 对于流式细胞样品, 每个样品的 YP1/PI 检测工作液的体积为 0.5ml。

b. YP1/PI 检测工作液的配制: 根据样品数量和每个样品所需工作液的体积, 计算出 YP1/PI 检测工作液的总体积。以流式细胞仪检测为例, 每个样品的 YP1/PI 检测工作液的体积为 0.5ml, 参考下表配制 YP1/PI 检测工作液。

样品数	2	20	200
YP1 (1000X)	1 μ l	10 μ l	100 μ l
PI (1000X)	1 μ l	10 μ l	100 μ l
检测缓冲液	998 μ l	9.98ml	99.8ml
YP1/PI检测工作液	1ml	10ml	100ml

注 1: 本试剂盒中提供的检测缓冲液在一段时间内可以维持细胞的正常状态, 并给细胞提供一定的营养, 效果通常比 PBS 或 HBSS 更好, 也可以用其它合适的溶液, 如无血清培养液代替。

注 2: 检测工作液中的 YP1 和 PI 的最终浓度需根据不同细胞系和实验体系通过预实验进行优化。

2. 荧光显微镜检测:

a. 接种培养。将细胞接种于 96 孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上, 按实验设计对细胞进行一定处理。

b. 洗涤(选做)。对于贴壁细胞, 吸除培养液, 用 PBS 洗涤细胞 1 次; 对于悬浮细胞, 250- 1000 $\times$ g 室温离心 5min, 吸除上清, 用 PBS 洗涤 1 次。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。在能充分吸净残留液体的情况下, 可以不使用 PBS 洗涤。

c. 染色。加入适当体积的 YP1/PI 检测工作液。通常 96 孔板每孔加入 100 μ l, 24 孔板每孔加入 250 μ l, 12 孔板每孔加入 500 μ l, 6 孔板每孔加入 1ml。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 5-20min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同, 以 5min 作为初始孵育时间, 后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化, 以得到更加理想的染色效果。

d. 检测。孵育结束后, 在荧光显微镜下观察荧光染色效果(YP1 染色阳性细胞为绿色荧光, Ex/Em=491/509nm; PI 染色阳性细胞为红色荧光,



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

Ex/Em=535/617nm)。对于悬浮细胞 MOLM13，本产品的荧光检测效果参考图 2。如有需要，也可进一步进行其它荧光的复染例如使用 Hoechst 33342 活细胞染色液染色细胞核等。注意整个过程均需注意避光操作。

3. 流式细胞仪检测:

a. 细胞准备。贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬，并用 PBS 洗涤一次；悬浮细胞 $250-1000 \times g$ 室温离心 5min，弃上清，用 PBS 洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为 106 个细胞。

b. 染色。对于上一步骤的 106 个细胞的沉淀，加入 0.5ml YP1/PI 检测工作液，重悬为单细胞悬液。 37°C 避光孵育 20min。注：需要准备好仅含缓冲液的细胞样品用作流式细胞仪检测时的阴性对照，该缓冲液与配制 YP1/PI 检测工作液的缓冲液宜保持一致。同时准备两管额外的细胞样品，每管只加入一种染料 (YP1 或 PI)，用于流式单染的补偿调节。

c. 检测。孵育完成后，可以直接进行流式细胞仪检测，也可以 $250-1000 \times g$ 室温离心 5min 沉淀细胞，吸净液体后每个样品加入 1ml 检测缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪检测 (YP1 染色阳性细胞为绿色荧光，Ex/Em=491/509nm；PI 染色阳性细胞为红色荧光，Ex/Em=535/617nm)。如有需要，也可进行进一步的染色。注意整个过程均需注意避光操作。染色后，将样品置于冰上，并尽量在 1 小时内进行流式细胞仪检测和分析。

注 1：使用仅含检测缓冲液的并且未经染色的细胞样品用于流式细胞仪的阴性对照设置。

注 2：细胞圈门(gate)时，注意不要圈入细胞碎片，并使用 YP1 或 PI 单染的细胞进行调节补偿。双染细胞流式检测应获得两个相对独立的细胞群:绿色荧光的调广细胞群和红色荧光阳性或者红色荧光和绿色荧光双阳性的坏死细胞群。坏死细胞的绿色荧光染色通常会比较弱一些。

注 3：由于流式检测比较灵敏，使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低，此时可根据细胞类型和实际染色情况对 YP1 或 PI 的稀释倍数进行适当调整。

4. 荧光酶标仪检测细胞死活的变化:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

a. 接种培养。将细胞接种于 96 孔板黑色多孔板中，每孔的细胞数需要控制在 100- 10,000 个，通常宜在 2000-5000 个范围内。按实验设计对细胞进行一定处理。

b. 洗涤(选做)。对于贴壁细胞，吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 遍；对于悬浮细胞，250- 1000×g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 1 遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用 PBS 洗涤。

c. 染色。加入适当体积的 YP1/PI 检测工作液，通常 96 孔板每孔加入 100 μ l。37° C 避光孵育 5-20min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以 5min 作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。

d. 检测。孵育结束后，用荧光酶标仪检测(YP1 染色阳性细胞为绿色荧光，Ex/Em=491/509nm；PI 染色阳性细胞为红色荧光，Ex/Em=535/617nm)。通过对比对照组两种荧光探针的 RFU (Relative fluorescence values)，可以得出凋亡细胞与坏死细胞数量的关系。

