



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒

货号: R20288

规格: 50T

保存温度: -20℃避光保存, 有效期 12 个月。

产品简介:

源叶生物 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit)是一种采用经典的碘化丙啶染色(PI staining)方法进行细胞周期与细胞凋亡分析的检测试剂盒, 碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种可以嵌合到双链 DNA 和 RNA 的碱基对中并与之结合的荧光染料, 无碱基特异性。碘化丙啶与双链 DNA 结合后可以产生荧光, 并且荧光强度和双链 DNA 的含量成正比; 细胞内的 DNA 被 Propidium Iodide 染色后可以用流式细胞仪对细胞进行 DNA 含量测定, 然后根据 DNA 含量的分布情况, 可以进行细胞周期和细胞凋亡的分析; 碘化丙啶染色后假设 G0/G1 期细胞的荧光强度为 1, 那么含有双份基因组 DNA 的 G2/M 期细胞的荧光强度的理论值为 2, 正在进行 DNA 复制的 S 期细胞的荧光强度为 1~2 之间。凋亡细胞由于细胞核发生浓缩以及发生 DNA 片段化(DNA fragmentation)导致部分基因组 DNA 片断在染色过程中丢失, 因此凋亡细胞碘化丙啶染色后呈现明显的弱染, 即荧光强度小于 1, 在流式检测的荧光图上出现所谓的 sub-G1 峰, 即凋亡细胞峰。

细胞凋亡时流式细胞检测可呈现亚二倍体核型的特征, 根据光散射的特点, PI 染色可以区分细胞凋亡和细胞坏死的细胞峰型, 细胞凋亡时出现凋亡细胞皱缩、染色质浓缩、核碎裂, 产生凋亡小体, 使细胞的前向光散射低于正常; 在细胞凋亡的早期, 细胞对前向角光散射的能力显著降低, 对侧向光散射的能力增加或没有变化; 在细胞凋亡的晚期, 前向和侧向光散射的信号均降低; 细胞坏死时细胞多表现为细胞肿胀, 因此前向光散射高于正常, 对侧向光散射高于正常。

源叶生物 Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit 经常用于培养的贴壁或悬浮细胞的细胞周期与细胞凋亡检测, 亦可用于区分细胞凋亡和细胞坏死, 其检测



细胞含量范围一般为 $0.1 \sim 1 \times 10^6$ 之间。该试剂仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

组成:

编号 名称	R20288-50T	Storage
试剂(A): PI Stain Buffer	25ml	-20℃
试剂(B): PI Stain(20×)	1.5ml	-20℃ 避光
试剂(C): RNase A Solution(50×)	0.5ml	-20℃
使用说明书	1 份	

自备材料:

- 1、胰蛋白酶消化液
- 2、流式细胞仪
- 3、PBS
- 4、预冷固定液: 预冷的 70%乙醇或 4%多聚甲醛

操作步骤(仅供参考):

1、细胞样品的制备:

(1)贴壁细胞:

①小心收集细胞培养液到一个无菌离心管内, 用胰蛋白酶消化细胞至可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时, 加入前面收集的细胞培养液, 吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞。

②收集上述细胞悬液到离心管内, 4°C 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底, 小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50 μl 培养液, 以免吸走细胞。

③加入约 1ml 提前预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移至 1.5ml 无菌离心管, 4°C 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。

④小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50 μl PBS, 以免吸走细胞, 轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。



(2)悬浮细胞:

①4℃ 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50μl 培养液, 以免吸走细胞。

②加入约 1ml 提前预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移至 1.5ml 无菌离心管, 4℃ 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。

③小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50μl PBS, 以免吸走细胞, 轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。

2、细胞的固定: 加入 1ml 冰浴预冷 70%乙醇中, 轻轻吹打混匀, 4℃条件下固定 2h 或更长时间。4℃固定 12~24h 可能效果更佳。

3、细胞的清洗:

①4℃ 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底, 小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50μl 溶液, 以免吸走细胞。

②加入约 1ml 提前预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移至 1.5ml 无菌离心管, 4℃ 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。

③小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50μl PBS, 以免吸走细胞, 轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。

4、PI 染色:

(1)一步法:

①配制 PI 染色工作液: 根据待检样品的数量, 取适量试剂(A)、试剂(B)、试剂(C)混合形成 PI 染色工作液, 以下表配制。配制好的 PI 染色工作液 4℃避光保存待用, 24h 有效。

	1 个样品	10 个样品
试剂(A): PI Stain Buffer	500μl	5ml
试剂(B): PI Stain(20×)	25μl	250μl
试剂(C): RNase A Solution(50×)	10μl	100μl
总量	535μl	5.35ml

②在每个待检细胞样品中, 加入 500μl 配制好的 PI 染色工作液, 轻轻重悬细胞沉淀, 置于 37℃避光水浴 30min。

(2)两步法:



①在沉淀细胞中加入 40 μ l PBS 和 10 μ l RNase A Solution(50 $\times$), 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 30min。

②配制 PI 染色工作液: 根据待检样品的数量, 取适量试剂(A)、试剂(B)混合形成 PI 染色工作液, 以下表配制。配制好的 PI 染色工作液 4 $^{\circ}$ C 避光保存待用, 24h 有效。

	1 个样品	10 个样品
试剂(A): PI Stain Buffer	500 μ l	5ml
试剂(B): PI Stain(20 $\times$)	25 μ l	250 μ l
总量	525 μ l	5.25ml

③在每个待检细胞样品中, 加入 500 μ l 配制好的 PI 染色工作液, 轻轻重悬细胞沉淀, 置于 4 $^{\circ}$ C 避光 30min。

5、检测与分析: 用流式细胞仪在激发波长 488nm 波长处检测红色荧光, 同时检测光散射情况, 采用适当分析软件进行细胞 DNA 含量分析和光散射分析。染色结果: 凋亡细胞 G1 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型, 在光散射谱上, 前向光散射低于正常, 侧向光散射高于正常。

注意事项:

- 1、荧光染料都存在淬灭的问题, 建议染色后尽快检测。
- 2、为减缓荧光淬灭可以使用抗荧光淬灭封片液。
- 3、在为了获得细胞沉淀的离心的过程中, 对于特殊细胞, 如果细胞沉淀不充分, 可以适当提高离心力或延长离心时间。
- 4、如果用于组织的细胞周期与细胞凋亡检测, 则必须把组织消化后, 制备成单细胞悬液, 才可以进行检测。
- 5、细胞凋亡时, 凋亡细胞的标志之一是 DNA 可染性降低, 但这种情况并不是绝对的, DNA 含量的降低或者 DNA 与染料结合能力下降也会导致 DNA 可染性降低, 在分析的时候应特别注意。
- 6、PI 对人体有一定刺激性, 请注意适当防护。
- 7、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。