

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒

产品简介:

Leagene 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。

Leagene 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。

产品组成:

名称	编号	DA0030	Storage
		50T	
试剂(A): PI Stain Buffer		25ml	RT
试剂(B): PI Stain(20×)		1.5ml	-20°C 避光
试剂(C): RNase A Solution(50×)		0.5ml	-20°C 避光
使用说明书			1 份

自备材料:

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

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 50µl 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 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)悬浮细胞:

①4°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 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°C 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°C条件下固定 2h 或更长时间。4°C固定 12~24h 可能效果更佳。

3、细胞的清洗:

①4°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 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°C 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	500 μ l	5ml
试剂(B): PI Stain(20 \times)	25 μ l	250 μ l
试剂(C): RNase A Solution(50 \times)	10 μ l	100 μ l
总量	535 μ l	5.35ml

②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 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℃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℃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℃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 可染行降低，但这种情况并非绝对的，DNA 含量的降低或者 DNA 与染料结合能力下降也会导致 DNA 可染行降低，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、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
- 8、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：12 个月有效，低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
CC0007	磷酸缓冲盐溶液(10×PBS,无钙镁)
CC0130	胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.25%:0.02%)
DA0001	DAPI 染色液(5ug/ml)
DE0001	碱性磷酸酶染色液(改良 Gomori 钙钴法)
DF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
NH0043	SSC 缓冲液(20×,pH7.0)
PE0103	Acr-Bis(30%,29:1)
TC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)