

细胞周期与凋亡检测试剂盒

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

-20℃避光保存, 有效期见外包装。

产品编号	产品名称	产品规格
YFXCA02	细胞周期与凋亡检测试剂盒	50T

产品组分

组分	50T
PI 染色液	500μL
RNase A	500μL
细胞染色液	25mL

一、产品说明

翼飞雪细胞周期与凋亡检测试剂盒能够通过碘化丙啶染色(Propidium staining; PI staining)对细胞周期及细胞凋亡情况进行分析, 适用于悬浮细胞、贴壁细胞及消化成单细胞状态的组织细胞的检测。

PI 是一种红色荧光探针, 与双链 DNA 结合后可产生荧光, 且荧光强度与双链 DNA 的含量成正比。PI 不能被动进入具有完整质膜的细胞, 所以 PI 的摄取与排除可用于区分活死细胞。PI 能够被 400-600nm 之间的波长激发, 发射波长是 600-700nm。水溶液中 PI 的最大激发/发射波长是 493/636nm, 结合核酸后的最大激发/发射波长为 535/617nm。

PI 染色后, 假设 G0/G1 期细胞的荧光强度为 1, 含有双份基因组 DNA 的 G2/M 期细胞的荧光强度理论上则为 2, 正在进 DNA 复制的 S 期细胞的荧光强度为 1-2。细胞发生凋亡时, 由于细胞核皱缩和 DNA 片段化, 部分基因组 DNA 片段在染色过程中丢失, 在 PI 染色后荧光强度会小于 1, 经流式细胞仪检测后会出现 sub-G1 峰, 即凋亡细胞峰。

另外, 细胞在发生凋亡时, 细胞的光散射情况也会发生变化。在凋亡早期, 染色质皱缩, 细胞密度增加, 细胞对前向角光散射的能力显著降低, 而对侧向角光散射能力增加或不变; 到了凋亡晚期, 细胞产生凋亡小体, 前向角和侧向角光散射的信号均会降低。基于本试剂盒, 通过流式细胞仪能够对细胞 DNA 含量及光散射情况进行检测。

二、操作步骤

1、细胞收集:

1.1 悬浮细胞: 收集约 10^5 - 10^6 个细胞, 4℃、1000g 离心 3-5min, 弃上清, 加入 1mL 预冷的 PBS 重悬细胞, 并转移到 1.5mL 离心管内。再次离心沉淀细胞, 弃上清 (可以残留约 50μL 左右的 PBS, 以避免吸走细胞)。

1.2 贴壁细胞: 将细胞培养液吸出, 转移至合适大小的离心管内。使用 PBS 轻柔清洗一次贴壁培养的细胞, 加入适量胰酶消化液消化细胞。室温孵育至细胞细胞形状逐渐变圆且松散, 将细胞轻柔吹打下来, 收集到同一离心管中, 4℃、1000g 离心 3-5min, 弃上清, 加入 1mL 预冷的 PBS 重悬细胞, 并转移到 1.5mL 离心管内。再次离心沉淀细胞, 弃上清 (可以残留约 50μL 左右的 PBS, 以避免吸走细胞)。

1.3 组织细胞: 用剪刀将组织剪成尽可能小的小块, 加入胰蛋白酶消化 0.5-1h, 经 200-400 目筛网过滤得到单细胞悬液。约 10^5 - 10^6 个细胞, 4℃、1000g 离心 3-5min, 弃上清, 加入 1mL

预冷的 PBS 重悬细胞, 并转移到 1.5mL 离心管内。再次离心沉淀细胞, 弃上清 (可以残留约 50 μ L 左右的 PBS, 以避免吸走细胞)。

2、细胞固定及漂洗:

向细胞中加入 1mL 预冷的 70%乙醇, 轻轻吹打混匀, 固定 2h 或更长时间。固定结束后, 1000g 离心 3-5min 收集细胞, 弃上清, 加入约 1mL 预冷的 PBS 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 弃上清。

3、细胞染色:

3.1 参考下表, 根据样本数量配制染色工作液:

试剂名称	1 个样本	6 个样本	12 个样本
细胞染色液	0.5mL	3mL	6mL
PI 染色液	10 μ L	60 μ L	120 μ L
RNase A	10 μ L	60 μ L	120 μ L
总体积	0.52mL	3.12mL	6.24mL

注: 染色液现用现配, 当天使用。

3.2 向每管细胞样品中加入 0.5mL PI 染色液, 轻柔重悬细胞, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min。孵育结束后可以 4 $^{\circ}$ C 或冰浴避光存放。建议尽快 (最好在 2-5h 内) 完成样本的流式检测。

4、流式检测:

使用流式细胞仪检测荧光情况, 并通过适宜的分析软件进行细胞 DNA 含量分析和光散射分析, PI 结合核酸后的最大激发/发射波长为 535/617nm。

注: 上机前可使用 200-400 目筛网过滤细胞悬液, 以得到分散的单个细胞。

三、注意事项

- 1、本方案仅提供一个指导方案, 请根据您的具体需要摸索优化条件。
- 2、建议固定 2h 及以上时间, 以更能保证染色效果, 固定 12-24h 效果更佳。
- 3、细胞固定也可以采用此方案: 先向细胞沉淀中加入 300 μ L PBS, 充分重悬吹散细胞后, 再加入 700 μ L 无水乙醇混匀, 得到 70%的乙醇固定液, 可以避免细胞成团或粘连。
- 4、对于特定细胞, 如果固定后离心时细胞沉淀不完全, 建议适当延长离心时间或加大离心力, 直至细胞完全沉淀。
- 5、细胞固定后体积会变轻, 离心时易悬浮, 可以将 PBS 替换成含 2% BSA 的 PBS, 辅助细胞沉淀。
- 6、去除固定液及漂洗细胞时, 每次吸弃上清可保留约 50 μ L 左右的液体, 以避免吸弃细胞样本。
- 7、染色液现用现配, 当天使用。
- 8、上机前可使用 200-400 目筛网过滤细胞悬液, 以得到分散的单个细胞。