# 产品简介：

**细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒**

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。

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。该试剂盒检测细胞含量范围

一般为 0.1～1×10 之间。

6

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **产品组成：** |  |  |
|  | 50T |
| 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℃ |

# 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：

⑴贴壁细胞：

① 小心收集细胞培养液到一个无菌离心管内备用。

② 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。

③ 收集上述细胞悬液到离心管内。

④ 4℃，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。

⑤ 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。

⑥ 4℃，1000g 离心 3～5min，使细胞沉到管底。

⑦ 小心吸取上清并丢弃，可留大约 50μl PBS，以免吸走细胞。

⑧ 轻轻弹击离心管底以适当分散细胞，避免细胞成团。

⑵悬浮细胞：

① 4℃，1000g 离心 3～5min，使细胞沉到管底。

② 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 4℃，1000g 离心 3～5min，使细胞沉到管底。

⑤ 小心吸取上清并丢弃，可留大约 50μl PBS，以免吸走细胞。

⑥ 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：

① 4℃，1000g 离心 3～5min，使细胞沉到管底。

② 小心吸取上清并丢弃，可留大约 50μl 溶液，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 4℃，1000g 离心 3～5min，使细胞沉到管底。

⑤ 小心吸取上清并丢弃，可留大约 50μl PBS，以免吸走细胞。

⑥ 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：

⑴ 一步法：

①□PI 染色工作液的配制：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。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。

⑵ 两步法：

①□在沉淀细胞中加入40μl PBS 和10μl RNase A Solution(50×)，置于37℃水浴30min。

②□PI 染色工作液的配制：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。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 |
| 总量 | 525μl | 5.25ml |

③□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 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。