北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒

产品简介:

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，其检测细胞含量范围一般为0.1 ~ 1×10^6 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:

编号 / 名称	GCDA0030 50T	Storage
试剂(A): PI Stain Buffer	25ml	RT
试剂(B): PI Stain(20×)	1.5ml	-20℃ 避光
试剂(C): RNase A Solution(50×)	0.5ml	-20℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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 40μl PBS 和 10μl RNase A Solution(50×)，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	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。

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
GCCC0007	磷酸缓冲盐溶液(10×PBS,无钙镁)
GCCC0130	胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.25%:0.02%)
GCDA0001	DAPI 染色液(5ug/ml)
GCDE0001	碱性磷酸酶染色液(改良 Gomori 钙钴法)
GCDF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
GCNH0043	SSC 缓冲液(20×,pH7.0)
GCPE0103	Acr-Bis(30%,29:1)
GCTC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)