



Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒

Cat. No. CW9106

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 (Propidium Iodide, 即PI) 染色方法进行细胞周期与细胞凋亡分析的检测试剂盒。

碘化丙啶是一种双链DNA的荧光染料。碘化丙啶和双链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被碘化丙啶染色后, 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片段在染色过程中丢失, 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。

细胞发生凋亡时, 由于胞浆和染色质浓缩、核碎裂, 产生凋亡小体, 使细胞的光散射性质发生变化。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。因此可通过流式细胞仪测定细胞光散射的变化观察细胞凋亡情况。

本试剂盒通常应用于培养的贴壁或悬浮细胞的细胞周期与细胞凋亡检测。如果用于组织的细胞周期与细胞凋亡检测, 则必须把组织消化成单细胞状态, 才可以进行检测。

保存条件

-20±5°C保存, 组分B需避光, 避免反复冻融。

产品内容

Component	CW9106T 10 T	CW9106S 50 T
A. 染色缓冲液	5 mL	25 mL
B. 碘化丙啶染色液 (20×)	0.25 mL	1.25 mL
C. RNase A (50×)	0.1 mL	0.5 mL

使用方法

实验材料 (自备)

1. 细胞株或其他细胞样品
2. 75-80%乙醇: 使用无水乙醇及超纯水配制, 提前备好并于-20°预冷
3. PBS
4. 胰酶
5. 含FBS的细胞培养基

实验步骤

1. 细胞样品的准备:
 - 1.1 对于贴壁细胞: 小心收集细胞培养液到一离心管内备用。用胰酶消化细胞, 至细胞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。再次收集到离心管内。1000×g左右离心3-5 min, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞沉淀不充分, 可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清, 可以残留约50 μL左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约1 mL冰浴预冷的PBS, 重悬细胞, 并转移到1.5 mL离心管内。再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 可以残留约50 μL左右的PBS, 以避免吸走细胞。轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。
 - 1.2 对于悬浮细胞: 1000×g左右离心3-5 min, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞沉淀不充分, 可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清, 可以残留约50 μL左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约1 mL冰浴预冷的PBS, 重悬细胞, 并转移到1.5 mL离心管内。再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 可以残留约50 μL左右的PBS, 以避免吸走细胞。轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。

2. 细胞固定: 加入1 mL冰浴预冷75-80%乙醇, 轻轻吹打混匀, 对于易成团的细胞, 要一边加入乙醇一边震荡混匀。如果细胞株本身极易成团, 可以先将细胞充分重悬在250 μ L的PBS中, 一边逐滴加入750 μ L的无水乙醇。乙醇终浓度控制在75%左右即可, PBS体积及无水乙醇体积可按比例调整。(注: 切记是先重悬在PBS中, 绝对不能重悬在培养基中再加无水乙醇。)将75-80%的乙醇重悬的样品置于-20 $^{\circ}$ C, 固定过夜。如果着急检测, -20 $^{\circ}$ C固定1-2 h也可以进行检测。乙醇固定的样品可以在-20 $^{\circ}$ C保存1个月。1000 \times g左右离心3-5 min, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞沉淀不充分, 可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清, 可以残留约50 μ L左右的75-80%乙醇, 以避免吸走细胞。加入约1 mL冰浴预冷的PBS, 重悬细胞。再次离心沉淀细胞, 尽可能将上清去除干净。
3. 碘化丙啶染色液的配制: 参考下表, 根据待检测样品的数量配制适量的碘化丙啶染色液:

组分	1个样品	6个样品	12个样品
染色缓冲液	0.5 mL	3 mL	6 mL
碘化丙啶染色液 (20X)	25 μ L	150 μ L	300 μ L
RNase A (50X)	10 μ L	60 μ L	120 μ L
最终体积	0.535 mL	3.21 mL	6.42 mL

注意: 1) 配制好的碘化丙啶染色液短时间内可以4 $^{\circ}$ C保存, 宜当日使用。

2) 一个样品的染色液至少可以染色10万个细胞。

3) 若染色的样本细胞数量小于10万, 也不建议降低染色液体积, 确保染料充足, 染色充分。

4. 染色: 每管细胞样品中加入0.5 mL碘化丙啶染色液, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 室温避光孵育15-30 min。随后可以4 $^{\circ}$ C或冰浴避光存放。染色完成后宜在24小时内完成流式检测, 最好能在当日完成流式检测。若细胞容易黏聚, 建议染色后用细胞过滤器过滤细胞。
5. 流式检测和分析: 用流式细胞仪在535 nm激发波长, 615 nm发射波长的通道检测红色荧光, 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。

注意事项

1. 荧光染料均存在淬灭问题, 保存和使用过程中请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
2. 碘化丙啶对人体有刺激性, 请注意适当防护。
3. 碘化丙啶是已知的诱变剂, 因此该溶液在丢弃之前需要先经过活性炭处理。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。