

Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit

Cat# CA0501

产品概述

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒（Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit）采用经典的碘化丙啶染色（PI staining）方法，通过流式细胞仪分析对细胞周期与细胞凋亡进行检测。

细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程。在这个过程中，细胞遗传物质复制并加倍，且在分裂结束时平均分配到两个子细胞中去。细胞周期分为间期与分裂期（M 期）两个阶段，间期又分为：休眠期（G0）、DNA 合成前期（G1 期）、DNA 合成期（S 期）与 DNA 合成后期（G2 期）。利用细胞内 DNA 能够和荧光染料（如碘化丙啶）结合的特性，细胞各个时期其 DNA 含量不同从而结合的荧光染料不同，检测到的荧光强度也不同，从而反应出细胞周期的各个期的状况，即细胞增殖状况。

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。PI 与双链 DNA 结合后可以产生荧光，并且荧光强度和双链 DNA 含量成正比。细胞内的 DNA 被 PI 染色后，可以用流式细胞仪对细胞进行 DNA 含量测定，从而进行细胞周期和细胞凋亡的分析。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。PI 染色还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，使细胞的前向角光散射（FSC）低于正常。在细胞凋亡的早期，细胞对前向角光散射（FSC）的能力显著降低，对侧向角光散射（SSC）的能力增加或没有变化。在细胞凋亡的晚期，FSC 和 SSC 的信号均降低。细胞坏死时细胞多表现为细胞肿胀，因此 FSC 高于正常，SSC 高于正常。

本试剂盒适用于检测培养的贴壁或悬浮细胞的细胞周期与细胞凋亡，亦可用于区分细胞凋亡与细胞坏死。当用于组织的细胞周期与细胞凋亡检测时，则须把组织消化成单细胞状态。该试剂盒检测每个样品细胞含量范围一般为 10^5 - 10^6 之间，足够检测 50 个样品。

产品/组分信息

组分编码	产品组分	CA0501-50T
CA0501-50T-1	Propidium Iodide (PI) (20×)	1.25 mL
CA0501-50T-2	RNase A (50×)	0.5 mL
CA0501-50T-3	Staining Buffer	25 mL

储存方式

-25~-15℃避光保存；Propidium Iodide (PI)(20)需避光保存。

使用说明

所需物料

PBS，无水乙醇等

操作步骤

1. 收集细胞

1.1 贴壁细胞

小心收集细胞培养液至离心管备用。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，吹打下所有贴壁细胞，并轻轻吹散。再次收集至离心管，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 50 μL 左右培养液，以避免吸走细胞。加入约 1 mL 预冷 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 50 μL 左右 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 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 50 μL 左右培养液，以避免吸走细胞。加入约 1 mL 预冷 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 50 μL 左右 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。

1.3 组织细胞

用剪刀将组织块剪成尽可能小的小块，加入胰酶消化 0.5-1 h，经 200-400 目筛网过滤得到单细胞悬液。4℃, 1000 g 离心 3-5 min，弃去上清。加入约 1 mL 预冷 PBS 重悬细胞，4℃, 1000 g 离心 3-5 min，弃去上清，保留细胞沉淀。

- 【注】:
- 1. 细胞样品尽量减少碎片的产生，请注意不要消化过度，不可过度吹打，离心转速不能过高。
 - 2. 如组织难以消化，可加入适量胶原酶。

2. 固定细胞

加入 1 mL PBS 将细胞沉淀充分重悬成单细胞，边涡旋边缓慢滴加预冷无水乙醇，至乙醇终浓度为 70%。4℃固定 4 h 以上，或者 4℃静置过夜（18-24 h）效果更佳，固定后的细胞可以置于-20℃保存一个月。

将固定好的细胞悬液 1000 g 左右离心 3-5 min，沉淀细胞。若细胞沉淀不充分，可以适当延长离心时间或稍加大离心力。小心吸弃上清，残留约 50 μL，以避免吸走细胞。

加入 1 mL 预冷 PBS 重悬细胞，再次 1000 g 左右离心 3-5 min 沉淀细胞，小心吸除上清，残留约 50 μL，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。

【注】：请按照本方法进行细胞固定的操作，尽量获得单个细胞，并避免 DNA 的降解。

3. 配制染色工作液

参考下表，按照染色缓冲液：碘化丙啶染色液（20×）：RNase A（50×）=100：5：2 的比例混合配制染色工作液，根据样品数量选择合适的工作液体积：

表 1 准备用于实验的染色工作液的配制

产品组分	1 个样品	6 个样品	12 个样品
Staining Buffer	0.5 mL	3 mL	6 mL
Propidium Iodide (PI) (20×)	25 μL	150 μL	300 μL
RNase A (50×)	10 μL	60 μL	120 μL

Final volume	0.535 mL	3.21 mL	6.42 mL
--------------	----------	---------	---------

【注】：配制好的碘化丙啶染色液短时间内可以 4°C 保存，宜当日使用。

4. 染色

每管细胞样品加入 500 μ L 染色工作液，轻柔并充分重悬细胞沉淀，37°C 避光温浴 30 min。染色完成后置于 4°C 避光存放，宜在 24 h 内完成流式上机检测。

【注】：

1. 荧光染料均存在淬灭问题，碘化丙啶染色液保存和使用过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。建议染色后尽量当天完成检测。
2. 碘化丙啶对人体有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。

5. 流式检测与分析

用流式细胞仪在激发波长 488 nm 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。

【注】：请使用流式细胞仪进行检测，进样速度调为低速，若峰形较宽，可能因为进样速度太快。

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

CYTOCH