

M5 细胞周期与凋亡检测试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 细胞周期与凋亡检测试剂盒	50T	MF474-01

【储存条件】

-20℃，避光保存

【产品简介】

细胞周期与凋亡检测试剂盒是一种采用经典的碘化丙啶染色(Propidium staining, 即 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, 简称 PI)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。

本试剂盒每个样品的细胞数量可以为 10-100 万。

【产品组份】

Dyeing Buffer 22.5 ml
25xPropidium Iodide, PI 750 μ l

【实验前准备及重要注意事项】

1. 本试剂盒需使用流式细胞仪进行检测。
2. 需自备 PBS、95%乙醇和 RNase A。
3. 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。
4. PI 对人体有刺激性, 请注意适当防护。
5. 请穿实验服并戴一次性手套操作。

【操作步骤】

1. 细胞样品的准备:

a. 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。1000xg 左右离心 3-5 分钟, 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 左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约 1 毫升冰浴预冷的 PBS, 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清。再次加入 1 ml 冰浴预冷的 PBS, 重悬细胞。

b. 对于悬浮细胞: 1000xg 左右离心 3-5 分钟, 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 微升左右的培养液, 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 毫升离心管内。再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 可以残留约 50 μ l 左右的 PBS, 以避免吸走细胞。再次加入 1 ml 冰浴预冷的 PBS, 重悬细胞。

2. 细胞固定:

取 4 毫升冰浴预冷的 95%乙醇, 低速涡旋震荡的同时加入 1 毫升细胞悬液, 混匀后 4℃固定 2 小时或更长时间。固定 12-24 小时可能效果更佳。1000×g 左右离心 3-5 分钟, 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 左右的乙醇, 以避免吸走细胞。加入约 5 ml 冰浴预冷的 PBS, 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 可以残留约 50 μ l 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。

3. PI 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 PI 染色液:

	1 个样品	6 个样品	12 个样品
Dyeing Buffer	0.4 ml	2.4 ml	4.8 ml
25xPropidium Iodide, PI	15 μ l	90 μ l	180 μ l
RNase A(10mg/ml, 自备)	1 μ l	6 μ l	12 μ l

注: 配制好的 PI 染色液短时间内可以 4℃保存, 宜当日使用。

4. 染色:

每管细胞样品中加入 400 μ l PI 染色液, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 37℃避光温浴 30 分钟。随后可以 4℃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。

5. 流式检测和分析:

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。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。