细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒

产品货号：R21806

产品规格：50T

产品简介：

乐业生物 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(DNAfragmentation)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。

乐业生物 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 0.1～1×10^6之间。

产品组成：

名称	50T	保存条件
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。

扫一扫 加微信
郑州乐业生物科技有限公司
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号
免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799
Q Q：807961520 731791866
邮箱：zzlybio@126.com

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：
①PI 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	500ul	5ml
试剂(B): PI Stain(20×)	25ul	250ul
试剂(C): RNase A Solution(50×)	10ul	100ul
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。
②PI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	500ul	5ml
试剂(B): PI Stain(20×)	25ul	250ul
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。

扫一扫 加微信
郑州乐业生物科技有限公司
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号
免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799
Q Q：807961520 731791866
邮箱：zzlybio@126.com

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。

扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号
免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799
Q Q：807961520 731791866
邮箱：zzlybio@126.com