

## Meilun Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit

### 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒

产品编号: MA0334 规格: 50T

#### 产品内容

产品组成	MA0334-50T
碘化丙锭 PI 染色液 (20×)	1.25 ml
RNase A (50×)	0.5 ml
染色缓冲液	25 ml
说明书	1 份

#### 产品简介

美仑细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit) 采用经典的碘化丙锭染色 (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 (如碘化丙锭) 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一样, 从而反应出细胞周期的各个期的状况, 即细胞增殖状况。

碘化丙锭 (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的含量成正比。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锭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。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。

## 操作步骤

### 一、细胞收集:

1. a. 对于贴壁细胞: 收集细胞培养液至离心管内备用。常规方法用胰酶消化细胞, 用之前收集的细胞培养液终止消化, 并轻轻吹散细胞, 收集至离心管内。【注意: 消化后的吹打需轻柔, 避免细胞破碎】  
b. 对于悬浮细胞: 小心吸取所有含有细胞的培养基至离心管内。
2. 将以上收集的细胞 1000g 左右离心 3-5min, 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 $\mu$ l, 以免吸走细胞。
3. 加入 1ml 预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移至 1.5ml 离心管内。再次 1000g 左右离心 3-5min, 沉淀细胞, 小心吸弃上清, 残留约 50 $\mu$ l, 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。

### 二、细胞固定:

1. 加入 1ml PBS 充分重悬, 成单细胞, 轻轻边涡旋边缓慢滴加 3ml 预冷的无水乙醇, 至终浓度 75%, 4 $^{\circ}$ C 固定 4h 以上, 或者 4 $^{\circ}$ C 静置过夜 (18-24h) 效果更佳。【固定后的细胞可以-20 $^{\circ}$ C 保存一个月】
2. 将固定好的细胞悬液 1000g 左右离心 3-5min, 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 $\mu$ l, 以免吸走细胞。
3. 加入 1ml 预冷的 PBS, 重悬细胞, 再次 1000g 左右离心 3-5min 沉淀细胞, 小心吸除上清, 残留约 50 $\mu$ l, 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。

### 三、染色工作液的配制:

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

	1 个样品	n 个样品
染色缓冲液	500 $\mu$ l	500 $\times$ n $\mu$ l
碘化丙啶 PI 染色液(20X)	25 $\mu$ l	25 $\times$ n $\mu$ l
RNase A(50X)	10 $\mu$ l	10 $\times$ n $\mu$ l
总体积	535 $\mu$ l	535 $\times$ n $\mu$ l

【注意：配制好的染色工作液短时间内可以 4℃ 保存，宜当天使用。】

#### 四、染色：

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

#### 五、流式检测和分析：

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。

#### 保存条件

-20℃ 保存，一年有效。碘化丙啶 PI 染色液(20X) 需避光保存。本试剂盒可 4℃ 保存，一个月内有效。

#### 注意事项

1. 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。
2. 请按照说明书提供的细胞固定方法进行操作，尽量获得单个细胞，并避免 DNA 的降解。
3. 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。
4. 需自备 PBS(美仑货号：MA0015) 和无水乙醇。
5. 荧光染料均存在淬灭问题，碘化丙啶 PI 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。
6. 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。
7. 为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。