

## YO-PRO-1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒

产品编号: MA0653 规格: 100T / 500T

### 产品内容

产品组成	MA0653-1 100T	MA0653-2 500T
YO-PRO-1 (1000×)	0.05mL	0.25mL
PI (1000×)	0.05mL	0.25mL
染色缓冲液	50mL	250mL
说明书	1 份	1 份

### 产品简介

YO-PRO-1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒是一种基于 DNA 绿色荧光染料 YO-PRO-1 (Oxazole yellow, YP1) 和红色荧光染料碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 的双荧光法检测细胞凋亡和坏死的试剂盒。

YO-PRO-1, 又名恶唑黄 (YP1), 是一种非细胞膜穿透性的羧花青单体和 DNA 绿色荧光染料。在没有与 DNA 结合的时候基本上没有荧光, 而与 DNA 结合后可以发出明亮的绿色荧光。在细胞凋亡发生时, 细胞膜通透性发生改变, 此时 YO-PRO-1 可以进入细胞内与 DNA 结合, 发出明亮的绿色荧光。YO-PRO-1 结合 DNA 后的最大激发光波长为 491nm, 最大发射波长为 509nm。

碘化丙啶 (PI) 是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂。它是一种溴化乙啶的类似物, 在嵌入双链 DNA 后释放红色荧光。PI 不能穿透完整细胞膜, 但对凋亡晚期细胞和死细胞的破损细胞膜能够穿透, 并使细胞核红染。PI-DNA 复合物的激发和发射波长分别为 535nm 和 617nm。

本试剂盒使用 YO-PRO-1 和 PI 配合用于分析和鉴定凋亡和坏死细胞, 可以同时进行凋亡细胞和坏死细胞的检测, 凋亡细胞呈现绿色荧光, 坏死细胞同时呈现红色和绿色荧光阳性, 活细胞很少或几乎没有荧光。本试剂盒作为一种细胞凋亡和坏死检测试剂盒, 可以应用于大多数的哺乳动物细胞, 包括贴壁细胞和悬浮细胞, 与传统的 Annexin V-FITC/PI 检测方法相比, 检测准确性和灵敏度相当, 可适用于荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测系统。

本试剂盒提供的 YO-PRO-1 和 PI 为 1000×溶液, 使用非常便捷。为了得到比较理想的染色结果, 请根据细胞类型和实验实际情况对探针染色液的稀释倍数进行适当调整。YO-PRO-1 的工作浓度一般为 0.5-5×, 推荐使用浓度为 1×; PI 的工作浓度为 0.1-4×, 推荐使用浓度为 1×。

### 使用方法

#### (一) 染色工作液的配制 (以 1000×稀释为例):

由于不同细胞种类、细胞浓度的染色条件不同, 建议自行摸索 YO-PRO-1 和 PI 的最适浓度。一般来说, 满足信号足够的前提下, 尽可能选择最低浓度的染料剂量。



根据样品数量和每个样品所需工作液的体积，计算出 YO-PRO-1/PI 染色工作液的总体积。对于 6、12、24、96 孔板，每孔 YO-PRO-1/PI 检测工作液的用量分别为 0.5~1mL、200~500 $\mu$ L、100~250 $\mu$ L 和 50~100 $\mu$ L；对于流式细胞样品，每个样品的 YO-PRO-1/PI 染色工作液的体积为 0.5mL。

下述按照 1:1000 稀释倍数/5mL 举例。

①取出 YO-PRO-1（1000 $\times$ ）、PI（1000 $\times$ ）和染色缓冲液，平衡至室温。

②在 5mL 的染色缓冲液中加入 5 $\mu$ L 的 YO-PRO-1（1000 $\times$ ）和 5 $\mu$ L 的 PI（1000 $\times$ ），涡旋震荡混匀制成工作液。

③所得到的工作液可直接用于染色细胞。

## （二）荧光显微镜检测：

①接种培养。将细胞接种于 96 孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上，按实验设计对细胞进行一定处理。

②洗涤。对于贴壁细胞，吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 次；对于悬浮细胞，250-1000 $\times$ g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 1 次。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用 PBS 洗涤。

③染色。加入适当体积的 YO-PRO-1/PI 染色工作液。通常 96 孔板每孔加入 100 $\mu$ L，24 孔板每孔加入 250 $\mu$ L，12 孔板每孔加入 500 $\mu$ L，6 孔板每孔加入 1mL。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10-20min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以 10min 作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。

④检测。孵育结束后，在荧光显微镜下观察荧光染色效果（YO-PRO-1 染色阳性细胞为绿色荧光， $E_x/E_m=491/509$ nm；PI 染色阳性细胞为红色荧光， $E_x/E_m=535/617$ nm）。如有需要，也可进一步进行其它荧光的复染，注意整个过程均需注意避光操作。

## （三）流式细胞仪检测：

①细胞准备。贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬，并用 PBS 洗涤一次；悬浮细胞 250-1000 $\times$ g 室温离心 5min，弃上清，用 PBS 洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为  $10^6$  个细胞。

②染色。对于上一步骤的  $10^6$  个细胞的沉淀，加入 0.5mL YO-PRO-1/PI 染色工作液，重悬为单细胞悬液。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20min。

注：需要准备好仅含缓冲液的细胞样品用作流式细胞仪检测时的阴性对照，该缓冲液与配制 YO-PRO-1/PI 检测工作液的缓冲液宜保持一致。同时准备两管额外的细胞样品，每管只加入一种染料（YO-PRO-1 或 PI），用于流式单染的补偿调节。

③检测。孵育完成后，可以直接进行流式细胞仪检测，也可以 250-1000 $\times$ g 室温离心 5min 沉淀细胞，吸净液体后每个样品加入 1mL 检测缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪检测（YO-PRO-1 染色阳性细胞为绿色荧光， $E_x/E_m=491/509$ nm；PI 染色阳性细胞为红色荧光， $E_x/E_m=535/617$ nm）。注意整个过程均需避光操作。染色后，尽量在 1h 内进行流式细胞仪检测和分析。

【注 1】：使用仅含检测缓冲液的并且未经染色的细胞样品用于流式细胞仪的阴性对照设置。



【注 2】：细胞圈门时，注意不要圈入细胞碎片，并使用 YO-PRO-1 或 PI 单染的细胞进行调节补偿。双染细胞流式检测应获得两个相对独立的细胞群：1、绿色荧光的凋亡细胞群；2、红色荧光阳性坏死细胞群或红色荧光和绿色荧光双阳性的坏死细胞群。坏死细胞的绿色荧光染色通常会比较弱一些。

【注 3】：由于流式检测比较灵敏，使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低，此时可根据细胞类型和实际染色情况对 YO-PRO-1 或 PI 的稀释倍数进行适当调整。

#### （四）荧光酶标仪检测细胞死活的变化：

①接种培养。将细胞接种于 96 孔黑色多孔板中，每孔的细胞数需要控制在 100-10000 个，通常宜在 2000-5000 个范围内。按实验设计对细胞进行一定处理。

②洗涤。对于贴壁细胞，吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 遍；对于悬浮细胞，250-1000×g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 1 遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用 PBS 洗涤。

③染色。加入适当体积的 YO-PRO-1/PI 检测工作液，通常 96 孔板每孔加入 100μL。37℃避光孵育 5-20min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以 5min 作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。

④检测。孵育结束后，用荧光酶标仪检测（YO-PRO-1 染色阳性细胞为绿色荧光， $E_x/E_m=491/509\text{nm}$ ；PI 染色阳性细胞为红色荧光， $E_x/E_m=535/617\text{nm}$ ）。通过对比对照组两种荧光探针的 RFU（Relative fluorescence values），可以得出凋亡细胞与坏死细胞数量的关系。

## 保存条件

-20℃避光密闭保存，自生产之日起 12 个月有效。染色缓冲液也可 2-8℃保存。

## 注意事项

1. 本试剂盒中的 YO-PRO-1 和 PI 量很少，有可能会粘在盖子或管壁上，开封前请先适当离心至管底。
2. 第一次使用前请将本品分装并于 -20℃冻存，避免反复冻融。建议根据单次用量分装密封保存。
3. 染色工作液必须现配现用，配制好的工作液请在当天使用。荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用本试剂盒的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。
4. 染色缓冲液应在无菌环境中使用，否则可能会被微生物污染而影响使用效果，甚至无法继续使用。
5. 本试剂盒作用于某些细胞系流式检测时，YO-PRO-1 和 PI 双染后，可能会使 YO-PRO-1 出峰位置发生偏移，十字门可能需要根据实际情况重新划分。
6. YO-PRO-1 和 PI 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. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
8. 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。

Y240901

