货号：ZC-A0341　　规格：50T

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒

产品简介：

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(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。

ZCIBIO 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：

编号 / 名称	ZC-A0341 50T	Storage
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℃
使用说明书	1 份	

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，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。

②收集上述细胞悬液到离心管内，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。

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℃ 1000g 离心 3～5min，使细胞沉到管底。

④小心吸取上清并丢弃，可留大约 50μl PBS，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。

⑵悬浮细胞：

①4℃ 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。

②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℃ 1000g 离心 3～5min，使细胞沉到管底。

③小心吸取上清并丢弃，可留大约 50μl PBS，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。

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：

①4℃ 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 溶液，以免吸走细胞。

②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℃ 1000g 离心 3～5min，使细胞沉到管底。

③小心吸取上清并丢弃，可留大约 50μl PBS，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。

4、PI 染色：

⑴ 一步法：

①配制 PI 染色工作液：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，以下表配制。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	500μl	5ml
试剂(B): PI Stain(20×)	25μl	250μl
试剂(C): RNase A Solution(50×)	10μl	100μl
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。

②配制 PI 染色工作液：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，以下表配制。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	500μl	5ml
试剂(B): PI Stain(20×)	25μl	250μl
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。

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。
4、 如果用于组织的细胞周期与细胞凋亡检测，则必须把组织消化后，制备成单细胞悬液，才可以进行检测。
5、 细胞凋亡时，凋亡细胞的标志之一是 DNA 可染行降低，但这种情况并是绝对的，DNA 含量的降低或者 DNA 与染料结合能力下降也会导致 DNA 可染行降低，在分析的时候应特别注意。
6、 PI 对人体有一定刺激性，请注意适当防护。
7、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期： 12 个月有效。亦可 4℃保存, 1 个月有效。