

Cell Cycle and Apoptosis Kit (细胞周期检测试剂盒)

产品介绍

细胞周期检测试剂盒 (Cell Cycle and Apoptosis Kit) 是一种采用经典的碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 染色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 片段在染色过程中丢失, 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。

应用范围

细胞周期检测

产品货号

C6031S/C6031L

储运条件

-20℃避光保存, 有效期见外包装; 冰袋运输。

产品特点

升级不堵管: PI 染料经结构优化后不堵管, 使用更方便;

分群效果好: 细胞分群效果明显。

产品组别

组分	C6031S (50 T)	C6031L (100 T)
A. 染色缓冲液	25 mL	50 mL
B. 碘化丙啶染色 (20×)	1.25 mL	2×1.25 mL
C. RNase A (50×)	0.5 mL	1 mL

注: 组分 B 碘化丙啶染色液 (20×) 需避光保存。

注意事项

- 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。
- 碘化丙啶对人体有刺激性, 请注意适当防护。

- 碘化丙啶是已知的诱变剂, 因此该溶液在丢弃之前需要先经过活性炭处理。
- 75%冰乙醇固定细胞一定要充分, 否则染色不均导致结果不明显或者偏差。建议 75%冰乙醇-20℃固定过夜。
- 细胞固定后要保证细胞是单细胞悬液, 细胞的粘连可能会影响我们的结果。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品和药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

1. 耗材

离心管

2. 试剂

(1)细胞株或其他细胞样品 (2)75~80%乙醇: 使用无水乙醇及超纯水配制, 提前备好并于-20℃ (3)PBS (4)胰酶 (5)含 FBS 的细胞培养基

3. 仪器

流式细胞仪

操作步骤

1. 细胞样品的准备

(1)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。1000×g 左右离心 3~5 min, 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 μL 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 mL 离心管内。再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 可以残留约 50 μL 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。

(2)对于悬浮细胞: 1000×g 左右离心 3~5 min, 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 μL 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 mL 离心管内。再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 可以残留约 50 μL 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。

2. 细胞固定

(1)加入 1 mL 冰浴预冷 75~80%乙醇, 轻轻吹打混匀, 对于易成团的细胞, 要一边加入乙醇一边震荡混匀。如果细胞株本身极易成团, 可以先将细胞充分重悬在 250 μL 的 PBS 中, 一边逐滴加入 750 μL 的无水乙醇 (预冷)。乙醇终浓度控制在 75%左右即可, PBS 体积及无水乙醇体积可按比例调整。

注: 切记是先重悬在 PBS 中, 绝对不能重悬在培养基中再加无水乙醇。

(2)将 75~80%的冰乙醇重悬的样品置于-20℃, 固定过夜。如果着急检测, -20℃固定 1~2 h 也可以进行检测。乙醇固定的样品可以在-20℃保存 1 个月。1000×g 左右离心 3~5 min, 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。

(3)小心吸除上清, 可以残留约 50 μL 左右的 75~80%乙醇, 以避免吸走细胞。加入约 1 mL 冰浴预冷的 PBS, 重悬细胞。再次离心沉淀细胞, 尽可能将上清去除干净。

3. 碘化丙啶染色液的配制

参考下表，根据待检测样品的数量配制适量的碘化丙啶染色液：

内容	1个样品	6个样品	12个样品
染色缓冲液	0.5 mL	3 mL	6 mL
碘化丙啶染色液 (20×)	25 μ L	150 μ L	300 μ L
RNase A (50×)	10 μ L	60 μ L	120 μ L
最终体积	0.535 mL	3.21 mL	6.42 mL

注：1)配制好的碘化丙啶染色液短时间内可以 4°C 保存，宜当日使用。

2)一个样品的染色液至少可以染色 10 万个细胞。

3)若染色的样本细胞数量小于 10 万，也不建议降低染色液体积，确保染料充足，染色充分。

4. 染色

(1)每管细胞样品中加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液，缓慢并充分重悬细胞沉淀，室温避光孵育 15~30 min。

(2)随后可以 4°C 或冰浴避光存放。染色完成后宜在 24 h 内完成流式检测，最好能在当日完成流式检测。若细胞容易黏聚，建议染色后用细胞过滤器过滤细胞。

5. 流式检测和分析

用流式细胞仪在 535 nm 激发波长，615 nm 发射波长的通道检测红色荧光，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。

6. 结果示例图 (图 1)

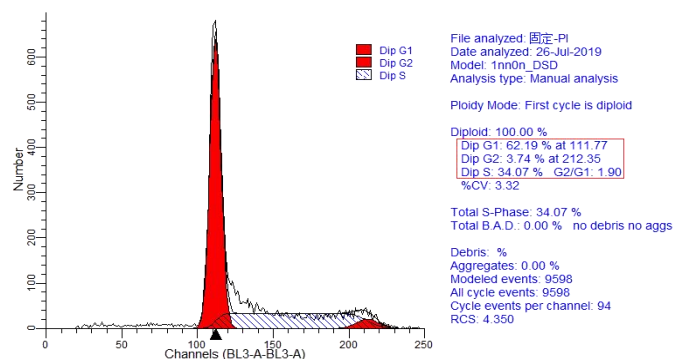


图 1 C6031 流式结果分析图

FAQ

1. 问：加大离心力和离心的时间，但细胞还是离心不下来是什么原因导致的？该怎么解决？

答：(1)药物导致的细胞状态不好，导致细胞肿胀，低于 PBS 的浓度，导致离心不下来。

(2)细胞固定的过程，非等渗溶液导致细胞肿胀破裂或者细胞肿胀后密度降低离心不下来。

(3)在操作过程中导致细胞破裂或者细胞本身状态不好。

建议用等渗的 1*PBS 稀释冰无水乙醇，保证等渗压；药物的浓度可以相应减低。保证细胞的良好状态，以及操作过程中的轻柔操作。

2. 问：75%乙醇加入到细胞中有明显大量白色絮状物析出是什么原因？该怎么解决？

答：可能是变性导致的白色絮状物。建议用冰乙醇进行-20°C固定过夜，可以有明显改善。

同系列产品

产品货号	产品名称	选购指南
C6031	Cell Cycle and Apoptosis Kit (细胞周期检测试剂盒)	PI 染料，不堵管，需要 RNase 消化去除 RNA，适合固定后的细胞染色
C6078	Cell Cycle Assay Kit Plus (细胞周期检测试剂盒升级版)	RedNucleus I 染料，特异性结合 dsDNA，适合固定细胞或者部分活细胞染色