

Cell Cycle and Apoptosis Kit Plus (细胞周期检测试剂盒升级版)

产品介绍

Cell Cycle Assay Kit Plus (细胞周期检测试剂盒升级版) 用于活细胞及固定细胞周期检测具有一定的适用性, 目前经过本公司验证过的细胞类型有 HeLa、Molt-4、Jurkat、K562, 对于 HeLa 及 Molt-4, 活细胞及 75%冰乙醇-20℃过夜固定后均可以检测, 但另外两种 Jurkat、K562, 活细胞状态及固定状态均不能检测。故针对不同类型的细胞, 是否适用, 需要测试后确定。

Cell Cycle Assay Kit Plus (细胞周期检测试剂盒升级版) 采用 RedNucleus I 染色法检测细胞周期, RedNucleus I 是一种远红外核酸染料, 具有细胞膜透性, 可快速进入活细胞, 特异结合 DNA, 对活细胞进行周期检测, 且无需 RNase 的消化。与传统的碘化丙啶染色 (PI staining) 方法相比, 细胞无需破膜或固定, 操作更加简便。

RedNucleus I 是一种双链 DNA 的荧光染料, 与双链 DNA 结合后的荧光强度和双链 DNA 的含量成正比。可通过流式细胞仪测定细胞内 DNA 含量, 然后根据 DNA 含量的分布情况, 进行细胞周期分析。RedNucleus I 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。此外, RedNucleus I 与 Horizon BV/BUV、FITC 和 R-PE 等染料兼容, 可在样品染色后进行周期检测。

本试剂盒通常应用于培养的贴壁或悬浮细胞的细胞周期检测, 如果用于组织的细胞周期检测, 则必须先把组织消化成单细胞状态。

应用范围

细胞周期检测

产品货号

C6078S/C6078

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: RedNucleus I 染料不堵管, 使用更方便;

分群效果好: 细胞分群效果明显。

产品组分

组分	C6078S (20 T)	C6078 (50 T)
A. 染色缓冲液 (10×)	4 mL	10 mL
B. RedNucleus I 染色液	80μL	200 μL

注: 组分 B RedNucleus I 染色液需避光保存。

注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
- 本产品适用于活细胞和固定细胞周期检测具有一定的局限性, 针对不同类型的细胞, 是否适用, 需要测试后确定。如需固定, 推荐使用冰浴预冷 75%—80%的乙醇-20℃过夜固定细胞。
- 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。

- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 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, 制成细胞悬液。

(2) 对于悬浮细胞或细胞悬液: 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, 以避免吸走细胞。加入约 1 mL 冰浴预冷的染色缓冲液 (将 10×的染色缓冲液用 diH₂O 按 1:10 稀释), 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, 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振荡混匀。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. 染色

(1) 每管细胞样品中加入 4 μL 的 RedNucleus I 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℃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。

4. 检测和分析

用流式细胞仪在 638 nm 处激发, 推荐在 RL3 或 FL4 通道检测, 也可使用 RL1、RL2 通道检测。采用适当分析软件进行细胞 DNA 含量分析和光散射分析。

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℃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