

细胞周期与细胞凋亡检测

货号: PMK0860

保存: 4°C干燥避光, 有效期12个月。

规格: 50T

用途: 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

产品简介:

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒是一种采用经典的碘化丙啶染色(PropidiumIodidestaining)方法进行细胞周期与细胞凋亡分析。

碘化丙啶(PropidiumIodide, 简称PI)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(DNAfragmentation)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。

本试剂盒足够检测50个样品, 每个样品的细胞数量可以为10-100万。

操作步骤:

1. 细胞样品的准备: 细胞数量控制在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个。

- 贴壁细胞: 小心吸除细胞培养液, 用胰酶消化细胞, 制备成单细胞悬液。1000g离心5min, 沉淀细胞, 弃上清, 用1mL预冷的PBS润洗细胞一次, 离心收集细胞。
- 悬浮细胞: 1000g离心5min, 沉淀细胞, 小心吸除上清。加入1mL预冷的PBS, 重悬细胞, 再次离心收集细胞。
- 组织细胞: 将组织块用剪刀剪成尽量小的小块后, 用0.25%的胰酶消化0.5-1h, 经过200-400目筛网过滤得到单细胞悬液。1000g离心5min, 沉淀细胞。加入约1mL预冷的PBS, 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞。如组织难以消化, 可加入适量胶原酶。

2. 细胞固定:

细胞沉淀用1mL预冷的70%乙醇轻轻混匀, 4°C固定2h以上或者过夜。然后1000g左右离心5min沉淀细胞后, 小心吸除上清, 可以残留约50微升左右的70%乙醇, 以避免吸走细胞。

加入1mL预冷的PBS重悬。然后再次1000g离心5min沉淀细胞。小心吸除上清, 可以残留约50微升左右的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。

3. 碘化丙啶染色液的配制:

产品说明书

对于1个样品，在0.5mL染色缓冲液中加入25uL碘化丙啶储液和10uLRNaseA溶液，混匀待用。其它数量的样品参考下表，根据待检测样品的数量配制适量的碘化丙啶染色液：

	1个样品	6个样品	12个样品
染色缓冲液	0.5ml	3ml	6ml
碘化丙啶染色液(20X)	25uL	150uL	300uL
RNaseA(50X)	10uL	60uL	100uL
Finalvolume	0.535mL	3.21mL	6.42mL

注：配制好的碘化丙啶染色液短时间内可以4℃保存，宜当日使用。

4. 染色：

每管细胞样品中加入0.5毫升碘化丙啶染色液，轻轻混匀重悬细胞沉淀，37℃避光孵育30分钟，就可以进行流式检测，流式检测最好在5h内完成。

5. 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。

注意事项：

- 1) 本试剂盒需要使用流式细胞仪进行检测。需自备PBS和70%乙醇。
- 2) 细胞处理需轻柔，尽量避免人为的损伤细胞。
- 3) 为防止不同批次细胞在实验时所处周期不同导致重复性差，可以在实验前进行细胞的同步化处理。实验细胞应处于对数生长期，贴壁细胞一般在50~80%汇合度时收集为宜。
- 4) 400目筛网过滤是用来将粘在一起的细胞团滤掉，留下单细胞，否则会出现人为的多倍体干扰。如果没有条件过滤，请在染色之前将细胞轻弹以分散，再进行染色。
- 5) 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。
- 6) 碘化丙啶对人体有刺激性，操作碘化丙啶时，应注意防护，保护眼睛、避免吸入。
- 7) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品：

PMK1300考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液

PMK053GAPDHmAb-HRPconjugated

PMK0312抗体稀释液

PMK1700PBST缓冲液

PMK1020IPTG溶液(50mg/ml)

PMK101030%丙烯酰胺(29:1)

PMK10705×Tris-甘氨酸电泳缓冲液

PMK0012SDS-PAGE凝胶制备试剂盒



更多产品详情了解，请关注公众号：

