

PI 细胞周期与凋亡试剂盒产品说明书

产品编号:

FY600002-20T

FY600002-50T

FY600002-100T

存储条件:

2-8 °C 避光 保存, 有效期2个月;

-20 °C 避光保存, 有效期12个月;

避免反复冻融。

产品组分:

编号	名称	20T	50T	100T
A	Propidium Iodide	200 μ l	500 μ l	1 ml
B	RNase A	200 μ l	500 μ l	1 ml
C	Staining Buffer	10 ml	25 ml	50 ml

产品简介:

本产品基于碘化丙啶 (Propidium, PI) 染色方法分析细胞周期和凋亡。碘化丙啶是一种双链DNA染料, 其嵌入双链DNA中可以产生荧光, 荧光的强度和双链DNA的量成正比。

在正常细胞周期中, G0和G1期有1套染色体, G2和M期细胞有2套染色体, S期介于两者之间。经PI染色后, 处在不同细胞周期中的细胞的荧光强度不同。假定G0和G1期的细胞荧光强度为1, 那么G2和M期的细胞的荧光强度为2, S期的细胞介于1和2之间。

细胞凋亡时, 由于细胞核皱缩和DNA片段化, 染色时DNA片段会从打孔的细胞膜处丢失, 流式细胞仪检测时, 荧光强度小于1, 即Sub-G1峰或者凋亡细胞峰。

细胞凋亡也可以用流式细胞仪观察细胞光散射的变化来检测。凋亡前期, 染色质皱缩, 细胞密度增加, 前向角光散射显著降低。凋亡后期, 细胞产生凋亡小体, 前向角光散射和侧向角光散色都显著降低。

本产品可用于培养的贴壁细胞或者悬浮细胞检测, 也可用于组织细胞检测。

自备耗材和设备:

1 ml 移液器

100-200 μ l 移液器

旋窝混匀仪

流式细胞仪

PBS

75%乙醇

适用实验与操作过程:

1. 细胞准备

贴壁细胞: 弃细胞培养液, 胰酶消化, 制备单细胞悬液, 1000 g离心5分钟, 弃上清。沉淀用1 ml预冷的PBS重悬。再次1000 g离心5分钟, 弃上清。

悬浮细胞: 收集细胞悬液, 1000 g离心5分钟, 弃上清。沉淀用1 ml预冷的PBS重悬。再次1000 g离心5分钟, 弃上清。

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0.5-1个小时。经过200-400目筛网过滤得到单细胞悬液。

1000 g离心5分钟, 弃上清, 沉淀用1 ml预冷的PBS重悬。再次1000 g离心5分钟, 弃上清。

注意, 最后一次离心, 弃上清后留50 μ l上清, 涡旋混匀。

2. 细胞固定

细胞沉淀用1 ml -20 °C 预冷的75%乙醇轻轻混匀, 4°C固定2小时以上或者过夜。然后, 1000 g离心5分钟, 轻轻弃上清, 沉淀用1 ml预冷的PBS重悬, 1000 g离心5分钟, 弃上清。

3. 染色

PI染色工作液配置: 0.5 ml染色缓冲液 (C液) 中加入10 μ l PI染液 (A液) 和10 μ l RNase A (B液), 混匀待用。每个细胞样品加入0.5 ml配置好的PI染色工作液, 轻轻混匀重悬细胞。37°C, 避光孵育30分钟, 直接上流式细胞仪检测 (5小时内完成为佳)。激发波长为488 nm, 检测红色荧光。

注意: 每个检测细胞数不超过 1×10^6 个。

注意事项与常见问题:

1. 是否需要防护?

PI具有毒性, 操作时应注意防护, 保护眼睛、避免吸入、并戴一次性手套。

2. 是否需要避光?

PI存在淬灭现象, 保存和使用过程中注意避光。

3. 单个反应的细胞数量是否有要求?

推荐细胞数量 10^5 - 10^6 个之间。若细胞数量太低, 流式细胞仪分析时会花费时间更长, 同时得到数据在统计上可能会有偏差。

细胞数量太高, 对于流式细胞仪分析没有必要, 同时操作过程中可能有不便之处; 且该方法要求PI的过饱和, 细胞数量过大会导致检测不准确。

4. 使用时需及时清洗流式细胞仪。

PI流式上机时具有一定的粘性, 请及时清洗流式细胞仪, 避免堵塞。连续上机数量过多也可能导致仪器堵塞导致数据误差, 可在检测到一定数量的样本时进行次氯酸清洗, 然后进行剩余样本的检测。