

产品信息

产品货号: REK0005

产品规格: 50T

保存条件: -20 °C避光保存, 有效期 12 个月。

产品组分:

编号	名称	50T
A	Propidium Iodide (20×)	1.25ml
B	RNase A (50×)	0.5ml
C	Staining Buffer	25ml

产品描述

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, 前向角光散色显著降低。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。

操作步骤

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 1ml 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

细胞周期检测试剂盒

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 25 µl PI 染液 (A 液) 和 10 µl 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。

操作说明

1. 使用前低速离心，以免液体积存管盖和管壁；
2. 本试剂只适用于实验，不适用于临床检测；
3. PI (propidium iodide, 溴化丙锭) 有毒性，能通过皮肤吸收，对眼睛有刺激作用，使用时需戴手套；
4. Annexin V-FITC 和 PI 是光敏物质，在操作时请注意避光。在处理和标记时，尽可能在暗处进行。在孵育阶段，用铝箔包裹容器或置于抽屉中。细胞标记后，在暗室内用显微镜观察；
5. 整个操作过程动作要尽量轻柔，勿用力吹打细胞，尽量在 4 °C 下操作，以免影响细胞状态。
6. 在细胞洗涤的最后一步，请尽量将上清弃净，以免 PBS 残留，有可能会影响实验结果。
7. 为防止荧光衰变，宜在 1 小时内进行流式检测。
8. PI 染色时间过长有可能造成检测的凋亡率偏高，建议首先进行 Annexin V-FITC 染色，最短可在上机前 5 分钟再加入 PI 染色。

注意事项

1. 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. PI 存在淬灭现象，保存和使用过程中注意避光。

本产品仅作科研实验使用，不支持临床等研究