

## 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒

### 产品简介:

Leagene 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit)是一种采用经典的碘化丙啶染色(PI staining)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(Propidium Iodide,PI)是一种可以嵌合到双链 DNA 和 RNA 的碱基对中并与之结合的荧光染料,无碱基特异性。碘化丙啶与双链 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 Propidium Iodide 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的分析;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 片断在染色过程中丢失,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。

细胞凋亡时流式细胞检测可呈现亚二倍体核型的特征,根据光散射的特点,PI 染色可以区分细胞凋亡和细胞坏死的细胞峰型,细胞凋亡时出现凋亡细胞皱缩、染色质浓缩、核碎裂,产生凋亡小体,使细胞的前向光散射低于正常;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;细胞坏死时细胞多表现为细胞肿胀,因此前向光散射高于正常,对侧向光散射高于正常。

Leagene Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit 经常用于培养的贴壁或悬浮细胞的细胞周期与细胞凋亡检测,亦可用于区分细胞凋亡和细胞坏死,其检测细胞含量范围一般为  $0.1 \sim 1 \times 10^6$  之间。该试剂仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成:

名称	编号	DA0030	Storage
试剂(A): PI Stain Buffer		50T 25ml	RT
试剂(B): PI Stain(20×)		1.5ml	-20°C 避光
试剂(C): RNase A Solution(50×)		0.5ml	-20°C 避光
使用说明书			1 份

**自备材料:**

- 1、胰蛋白酶消化液、PBS、预冷固定液：预冷的 70%乙醇或 4%多聚甲醛
- 2、流式细胞仪

**操作步骤(仅供参考):**

## 1、细胞样品的制备:

## (1)贴壁细胞:

- ①小心收集细胞培养液到一个无菌离心管内,用胰蛋白酶消化细胞至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。
- ②收集上述细胞悬液到离心管内,4°C 1000g 离心 3 ~ 5min,使细胞沉到管底,小心吸取上清并丢弃,可留大约 50 $\mu$ l 培养液,以免吸走细胞。
- ③加入约 1ml 提前预冷的 PBS,重悬细胞,并转移至 1.5ml 无菌离心管,4°C 1000g 离心 3 ~ 5min,使细胞沉到管底。
- ④小心吸取上清并丢弃,可留大约 50 $\mu$ l PBS,以免吸走细胞,轻轻弹击离心管底以适当分散细胞,避免细胞成团。

## (2)悬浮细胞:

- ①4°C 1000g 离心 3 ~ 5min,使细胞沉到管底小心吸取上清并丢弃,可留大约 50 $\mu$ l 培养液,以免吸走细胞。
- ②加入约 1ml 提前预冷的 PBS,重悬细胞,并转移至 1.5ml 无菌离心管,4°C 1000g 离心 3 ~ 5min,使细胞沉到管底。
- ③小心吸取上清并丢弃,可留大约 50 $\mu$ l PBS,以免吸走细胞,轻轻弹击离心管底以适当分散细胞,避免细胞成团。

## 2、细胞的固定: 加入 1ml 冰浴预冷 70%乙醇中,轻轻吹打混匀,4°C条件下固定 2h 或更长时间。4°C固定 12 ~ 24h 可能效果更佳。

## 3、细胞的清洗:

- ①4°C 1000g 离心 3 ~ 5min,使细胞沉到管底,小心吸取上清并丢弃,可留大约 50 $\mu$ l 溶液,以免吸走细胞。
- ②加入约 1ml 提前预冷的 PBS,重悬细胞,并转移至 1.5ml 无菌离心管,4°C 1000g 离心 3 ~ 5min,使细胞沉到管底。
- ③小心吸取上清并丢弃,可留大约 50 $\mu$ l PBS,以免吸走细胞,轻轻弹击离心管底以适当分散细胞,避免细胞成团。

## 4、PI 染色:

## (1) 一步法:

- ①配制 PI 染色工作液: 根据待检样品的数量,取适量试剂(A)、试剂(B)、试剂(C)混合形成

PI 染色工作液,以下表配制。配制好的 PI 染色工作液 4℃避光保存待用,24h 有效。

	1 个样品	10 个样品
试剂(A): PI Stain Buffer	500 $\mu$ l	5ml
试剂(B): PI Stain(20 $\times$ )	25 $\mu$ l	250 $\mu$ l
试剂(C): RNase A Solution(50 $\times$ )	10 $\mu$ l	100 $\mu$ l
总量	535 $\mu$ l	5.35ml

②在每个待检细胞样品中, 加入 500 $\mu$ l 配制好的 PI 染色工作液,轻轻重悬细胞沉淀, 置于 37℃避光水浴 30min。

(2) 两步法:

①在沉淀细胞中加入 40 $\mu$ l PBS 和 10 $\mu$ l RNase A Solution(50 $\times$ ),置于 37℃水浴 30min。

②配制 PI 染色工作液: 根据待检样品的数量,取适量试剂(A)、试剂(B)混合形成 PI 染色工作液,以下表配制。配制好的 PI 染色工作液 4℃避光保存待用,24h 有效。

	1 个样品	10 个样品
试剂(A): PI Stain Buffer	500 $\mu$ l	5ml
试剂(B): PI Stain(20 $\times$ )	25 $\mu$ l	250 $\mu$ l
总量	525 $\mu$ l	5.25ml

③在每个待检细胞样品中, 加入 500 $\mu$ l 配制好的 PI 染色工作液,轻轻重悬细胞沉淀, 置于 4℃避光 30min。

5、检测与分析: 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。

**染色结果:** 凋亡细胞 G1 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型,在光散射谱上,前向光散射低于正常,侧向光散射高于正常。

#### 注意事项:

- 1、 荧光染料都存在淬灭的问题,建议染色后尽快检测。
- 2、 为减缓荧光淬灭可以使用抗荧光淬灭封片液。
- 3、 在为了获得细胞沉淀的离心的过程中,对于特殊细胞,如果细胞沉淀不充分,可以适当提高离心力或延长离心时间。
- 4、 如果用于组织的细胞周期与细胞凋亡检测,则必须把组织消化后,制备成单细胞悬液,才可以进行检测。
- 5、 细胞凋亡时,凋亡细胞的标志之一是 DNA 可染行降低,但这种情况并非绝对的,DNA 含量的降低或者 DNA 与染料结合能力下降也会导致 DNA 可染行降低,在分析的时候应特别注意。

- 6、PI 对人体有一定刺激性,请注意适当防护。
- 7、试剂开封后请尽快使用,以防影响后续实验效果。
- 8、为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期:** 12 个月有效,低温运输,按要求保存。

#### 相关产品:

产品编号	产品名称
CC0007	磷酸缓冲盐溶液(10×PBS,无钙镁)
CC0130	胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.25%:0.02%)
DA0001	DAPI 染色液(5ug/ml)
DE0001	碱性磷酸酶染色液(改良 Gomori 钙钴法)
DF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
NH0043	SSC 缓冲液(20×,pH7.0)
PE0103	Acr-Bis(30%,29:1)
TC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)

#### 文献引用:

- 1、Xiao Li,Kejing Zhang,Yingwen Xue,et al.Continuous immobilization of lead by biomineralization in a fluidized-bed biofilm reactor.Journal of Cleaner Production.October 2022.10.1016/j.jclepro.2022.134765.(IF 11.072)
- 2、Yingwei Wang,Jiixin Wu,Jiamin Chen,et al.Mesenchymal stem cells paracrine proteins from three-dimensional dynamic culture system promoted wound healing in third-degree burn models.Bioengineering & Translational Medicine.July 2023.10.1002/btm2.10569.(IF 7.4)
- 3、Yuan Qingling,Fan Yuxia,Liu Zheng,et al.Pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G4 (PLEKHG4) leads to the activation of RhoGTPases promoting the malignant phenotypes of thyroid cancer.AP OPTOSIS.June 2023.10.1007/s10495-023-01861-1.(IF 7.2)
- 4、ZiBo Tang,Welfeng Chen,Yan Xu,et al.miR-4721,Induced by EBV-miR-BART22,Targets GSK3β to Enhance the Tumorigenic Capacity of NPC through the WNT/β-catenin Pathway.Molecular Therapy-Nucleic Acids.September 2020.10.1016/j.omtn.2020.09.021.(IF 7.032)
- 5、Yuxi Ding,Xiaoling Liu,Yue Yuan,et al.THRSP identified as a potential hepatocellular carcinoma marker by integrated bioinformatics analysis and experimental validation.Aging-US.February 2022.10.18632/aging.203900.(IF 5.955)
- 6、Zhe Hu,Jinlan Meng,Hongbing Cai,et al.KIF 3A inhibits nasopharyngeal carcinoma proliferation, migration and invasion by interacting with β-catenin to suppress its nuclear accumulation..American Journal of Cancer Research.November 2022.PMID:36504907.(IF 5.942)
- 7、Hu Zhe,Wu Yilin,Sun Xiaou,et al.ARM CX1 inhibits lung adenocarcinoma progression by recruiting FBXW7 for c-Myc degradation.Biology Direct.September 2024.10.1186/s13062-024-00532-8.(IF 5.7)
- 8、Zhecun Wang,Yunling Qi,Rui Wang,et al.IGFBP6 regulates vascular smooth muscle cell proliferation and morphology via cyclin E-CDK2.JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY.June 2020.10.1002/jcp.29762.(IF 5.546)
- 9、Su Min,Wang Xueqin,Cao Gang,et al.Prediction of the potential mechanism of compound gingerol against liver cancer based on network pharmacology and experimental verification.JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY.April 2022.10.1093/jpp/rgac002.(IF 4.81)
- 10、Xiaohua Zhu,Xie YingYing,Huang Wenyan,et al.NAP1L1 promotes tumor proliferation through HDGF/C-JUN signaling in ovarian cancer.BMC CANCER.March 2022.10.1186/s12885-022-09356-z.(IF 4.638)

注:更多使用本产品的文献请参考产品网页