

Elite 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒使用说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-5601	Elite Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit	50T/100T/500T
EK-5601-A	染色缓冲液	25mL/50mL/250mL
EK-5601-B	PI 染色液 (20×)	1.25mL/2.5mL/12.5mL
EK-5601-C	RNase 溶液 (50×)	0.5mL/1mL/5mL
	使用说明书	1 份

【保存条件】

-20°C避光保存，有效期 12 个月

【概述】

Elite 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(Elite Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit)是一种采用经典的碘化丙啶染色 (Propidium staining, 即 PI staining)方法进行细胞周期与细胞凋亡分析的检测试剂盒。碘化丙啶能够嵌入碱基对之间实现与双链 DNA 结合。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(DNA fragmentation)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，每个样品的细胞数量可以为 10-100 万。

【使用方法（仅供参考）】

1. 细胞样品的准备:

a. 对于贴壁细胞：小心收集细胞培养液到一离心管内备用。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。1000×g 左右离心 3-5 分钟，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 50μL 左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1mL 冰浴预冷的 PBS，重悬细胞，并转移到 1.5mL 离心管内。再次离心沉淀细胞，小心吸除上清，可以残留约 50μL 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。

b. 对于悬浮细胞：1000×g 左右离心 3-5 分钟，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 50μL 左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1mL 冰浴预冷的 PBS，重悬细胞，并转移到 1.5mL 离心管内。再次离心沉淀细胞，小心吸除上清，可以残留约 50μL 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。

2. 细胞固定：在持续轻轻震荡（Vortex）的情况下，缓慢滴加预冷的 1mL 70%乙醇，轻轻吹打混匀，4°C 固定 30 分钟或更长时间。通常固定 2 小时或以上更能保证染色效果，固定 12-24 小时可能效果更佳。

1000×g 左右离心 3-5 分钟，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 50μL 左右的 70%乙醇，以避免吸走细胞。加入约 1mL 冰浴预冷的 PBS，重悬细胞。再次离心沉淀细胞，小心吸除上清，可以残留约 50μL 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. 碘化丙啶染色混合液的配制：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
PI 染色液 (20×)	25μL	150μL	300μL
RNase 溶液 (50×)	10μL	60μL	120μL
总体积	0.535mL	3.21mL	6.42mL

4. 染色：每管细胞样品中加入 0.5mL 碘化丙啶染色混合液，缓慢并充分重悬细胞沉淀，37°C 避光温浴 30 分钟。随后可以 4°C 或冰浴避光存放。染色完成后宜在 24 小时内完成流式检测，最好能在当日完成流式检测。

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. RNase A 的作用：PI 亦能结合 RNA。本试剂盒内置 RNase A，孵育步骤不可跳过，否则会造成背景荧光极高，周期峰变宽。

2. 细胞密度：检测时细胞浓度建议在 1×10^5 - 1×10^6 /mL 之间，过高会导致染色不均，过低会导致数据采集时间过长。

3. **避光注意:** 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。
4. **安全防护:** 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. **科研用途:** 仅用于实验室研究，不适合农业/家庭/临床用途使用。