

ClearV™ Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit

产品简介

本产品采用了经典的碘化丙啶染色（Propidium staining，即 PI staining）方法对细胞周期与细胞凋亡进行分析。碘化丙啶（Propidium, PI）是一种双链 DNA 荧光染料，其嵌入双链 DNA 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 PI 染色后，可以用流式细胞仪对细胞进行 DNA 含量测定。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 PI 染色后呈现弱染，荧光强度小于 1，在流式荧光图上出现 sub-G1 峰，即凋亡细胞峰。

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。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。凋亡前期，染色质皱缩，细胞密度增加，前向角光散射性显著降低。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。

本试剂盒通常应用于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。

产品规格

产品货号	C331408E	C331408S
产品规格	50 T	100T

组分信息

组分编号	组分名称	C331408E	C331408S
C331408-A	RNase A	0.5 mL	1 mL
C331408-B	PI Solution	0.5 mL	1 mL
C331408-C	Staining Solution	25 mL	25 mL*2

产品储存

冰袋（wet ice）运输。-20℃ 避光保存，有效期为 2 年。

【注】：如果需要在短时间内多次重复使用，可以于 4℃ 避光保存，2 个月内有效。

操作注意

1. 本试剂盒需要使用流式细胞仪进行检测。
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. 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。
8. 本产品仅作科研用途！

操作说明

1. 样品制备：

细胞数量控制在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个。

- a) **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。1000 g 离心 5 min，沉淀细胞，弃上清，用 1 mL 预冷的 PBS 润洗细胞一次，离心收集细胞。
- b) **悬浮细胞**：1000 g 离心 5 min，沉淀细胞，小心吸除上清。加入 1 mL 预冷的 PBS，重悬细胞，再次离心收集细胞。
- c) **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 h，经过 200-400 目筛网过滤得到单细胞悬液。1000 g 离心 5 min，沉淀细胞。加入约 1 mL 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 1 mL 预冷的 70%乙醇轻轻混匀，4°C 固定 2 h 以上或者过夜。接下来 1000 g，离心 5 min 沉淀细胞后，用 1 mL 预冷的 PBS 重悬。然后再次 1000 g 离心 5 min 沉淀细胞。

3. 染色

在 0.5 mL Staining Solution (C331408-C) 中加入 10 μ L PI Solution (C331408-B) 和 10 μ L RNase A (C331408-A) 溶液，混匀待用。每个细胞样品加入 0.5 mL 配置好的碘化丙啶染色液，轻轻混匀重悬细胞。37°C 避光孵育 30 min，就可以进行流式检测，流式检测最好在 5 h 内完成。

【注】：配置好的 PI 染色液在短时间内可以 4°C 保存，宜当日使用。

4. 流式检测和分析

细胞用 400 目筛网过滤，用流式细胞仪进行检测，在激发波长 488 nm 波长处检测，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。