

PI 细胞周期检测试剂盒(含 RNase A)

Catalog No.	Size
FXP0211-050	50 Tests
FXP0211-100	100 Tests
FXP0211-200	200 Tests

相关介绍:

碘化丙啶(Propidium, 简称 PI)是一种双链 DNA 的荧光染料。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。

本试剂盒通常应用于培养的贴壁或悬浮细胞的细胞周期检测。如果用于组织的细胞周期检测,则必须把组织消化成单细胞状态,才可以进行。

本试剂盒每个样品的细胞数量可以为 10-100 万。

储存条件:

碘化丙啶染色液(25X)需避光保存。染色缓冲液和碘化丙啶溶液(25X) 4℃保存, RNase A -20℃保存。12 个月内有效。

试剂盒组份:

货号	染色缓冲液	碘化丙啶溶液(25X)	RNase A (2.5mg/ml)
FXP0211-050	20 ml	0.75 ml	0.2 ml
FXP0211-100	40 ml	1.5 ml	0.4 ml
FXP0211-200	80 ml	3.0 ml	0.8 ml

使用说明:

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。300~400g 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 50 微升左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1 毫升冰浴预冷的 PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清。再次加入 1 毫升冰浴预冷的 PBS，重悬细胞。

b. 对于悬浮细胞：300~400g 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 50 微升左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1 毫升冰浴预冷的 PBS，重悬细胞，并转移到 1.5 毫升离心管内。再次离心沉淀细胞，小心吸除上清，可以残留约 50 微升左右的 PBS，以避免吸走细胞。再次加入 1 毫升冰浴预冷的 PBS，重悬细胞。

2. 细胞固定：取 4 毫升冰浴预冷的 95%乙醇，把 1 毫升细胞悬液（细胞放在冰上）逐滴加到乙醇溶液里，充分混匀后 4℃固定 2 小时或更长时间。固定 12-24 小时可能效果更佳。300~400g 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 50 微升左右的乙醇，以避免吸走细胞。加入约 5 毫升冰浴预冷的 PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清，可以残留约 50 微升左右的 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 个样本	6 个样本	12 个样本
染色缓冲液	0.4ml	2.4ml	4.8ml
碘化丙啶染色液(25X)	15 μ l	90 μ l	180 μ l
RNase A(2.5mg/ml)	4 μ l	24 μ l	48 μ l

注：配制好的碘化丙啶染色液短时间内可以 4℃保存，宜当日使用。

4. 染色：每管细胞样品中加入 0.4 毫升碘化丙啶染色液，缓慢并充分重悬细胞沉淀，37℃避光温浴 30 分钟。随后可以 4℃或冰浴避光存放。

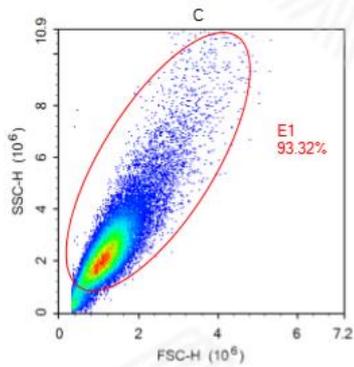
5. 加入 2ml PBS，300~400g 离心 5 分钟，去上清；

6. 加入 500 μ l 的 PBS，用流式细胞仪上机检测。（注：24 小时内完成流式检测）

7. 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。

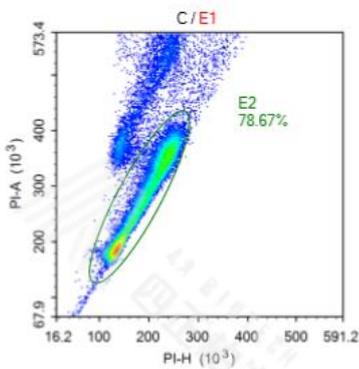
数据分析

1、选中目的细胞群，去除碎片。



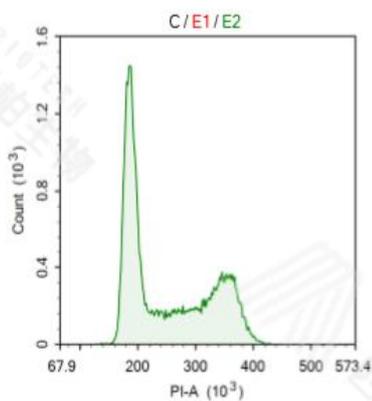
Gate	Count	% All	Median X	Median Y
All	53,578	100.00%	1,145,796	2,171,398
E1	50,000	93.32%	1,173,049	2,229,619

2、通过 PI 通道上的面积 (PI-A) 和高 (PI-H) 把粘连的细胞去除。这一步也可以用 PI 通道上的宽 (PI-W) 和高 (PI-H) 把粘连的细胞去除。



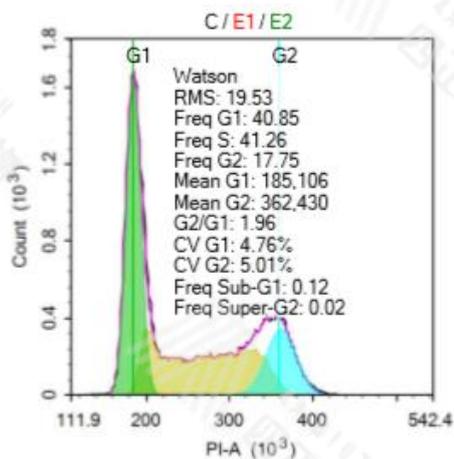
Gate	Count	% E1	Median X	Median Y
E1	50,000	100.00%	171,294	271,349
E2	39,337	78.67%	150,553	216,097

3、流式上可以看到 PI 通道荧光信号看到 G0/G1、S 及 G2 的大体位置。



Gate	Count	% E2	Median X
E2	39,337	100.00%	216,097

4、选用分析周期的软件进行数据拟合，下图中显示了周期软件分析后的结果。

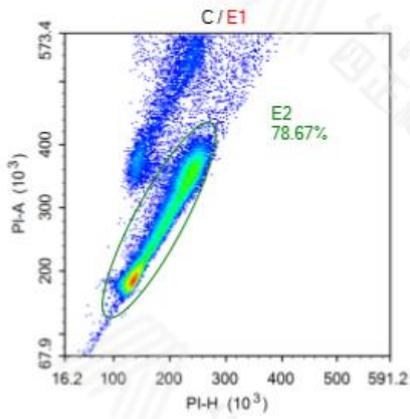


RMS	Freq G1	Freq S	Freq G2	G2/G1	CV G1
19.53	40.85	41.26	17.75	1.96	4.76%

注意事项

- 1、一般取细胞生长至覆盖率约为 80%时（确保细胞未进入生长平台期）进行实验，但细胞生长密度过高,会出现接触抑制,可导致 G2/M 期缺失现象出现。
- 2、贴壁细胞的消化时间要控制好，可边消化边观察，获得单个细胞，尽量避免 DNA 的降解，细胞消化固定后不可过度吹打，防止细胞碎片。
- 3、为保证上机细胞数足够，染色前要进行细胞计数，保证细胞数与染料浓度匹配，避免样本管间差异较大。一般来说细胞浓度控制在 2×10^5 - 2×10^6 个细胞/毫升。并确保细胞数和固定剂量和染料的浓度相匹配。
- 4、使用离心机时，离心 300~400g，且动作尽量轻柔，切记不要用力吹打细胞，尽量在 4℃ 下操作，以免影响细胞状态。
- 5、醇类固定后的样品可以在 -20℃ 存放几个星期，若短时间可置于 4℃ 避光保存。
- 6、上机前，细胞过 200 目筛网，尽量除去细胞团。
- 7、上样速度不宜过快，细胞浓度不宜过高，一般选择低速收细胞, 200 个细胞/秒为佳。
- 8、收细胞目的细胞 20000 个以上的目的细胞。

见下图 E2 门：



Gate	Count	% E1	Median X	Median Y
E1	50,000	100.00%	171,294	271,349
E2	39,337	78.67%	150,553	216,097

9、DNA 染料，尤其是 PI，具有较强的粘性。样本上机检测之后，应遵照仪器说明书仔细清洗流式细胞仪，以免对下一位操作者结果造成影响。

10、通过电压脉冲信号的宽度和面积区别实体组织标本中的粘连细胞群体，最大程度的减少粘连细胞带来的假阳性结果。