

Superbrilliant® 细胞周期染色分析试剂盒
Superbrilliant® Cell Cycle Detection Kit

Cat.No.: ZS-C31003

组分

货号	组 分	ZS-C-31003S (20T)	ZS-C-31003M (50T)	ZS-C-31003L (100T)
103062	PI Staining Buffer	10 ml	25 ml	50 ml
103003	Rnase A(10 mg/ml)	0.1 ml	0.25 ml	0.5 ml
	说明书	1 份	1 份	1 份

储存：（1）首次使用前将 Rnase A 全部加到 PI Staining Buffer 中混合均匀 2～8℃可保存 6 个月。

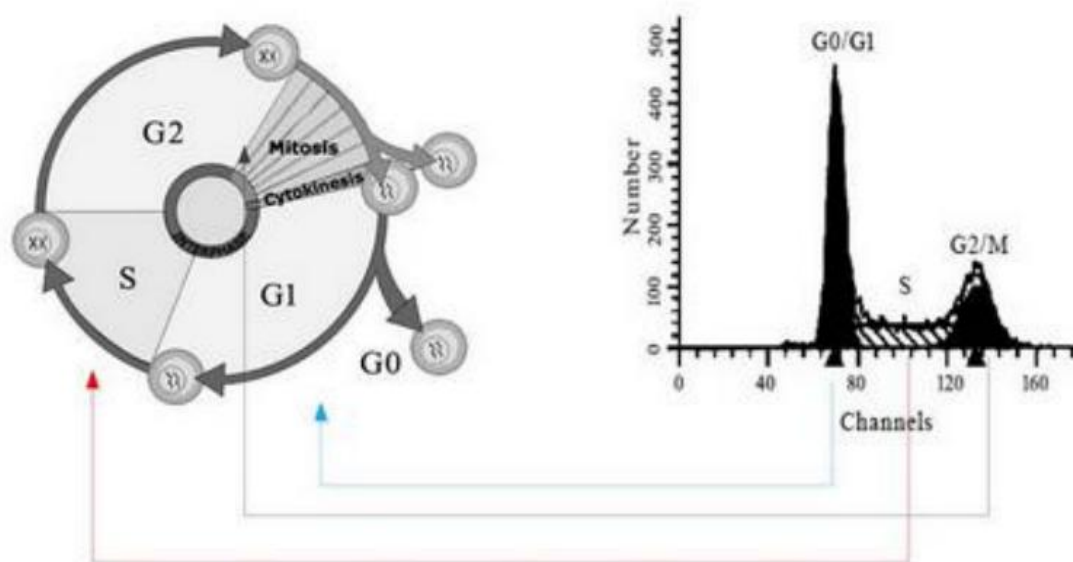
（2） 2～8℃，有效期 2 年。

简介: 细胞周期 (cell cycle) 是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程, 由细胞周期素 (Cyclin) 依次激活相应的细胞周期蛋白依赖激酶 (CDK) 所推动。XDK 周期性积累与分解对细胞周期进展起着正调控作用, 而细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKI) 通过在细胞周期适当的时间点上抑制 CDK 的活性, 从而对细胞周期进展起负调控作用。细胞周期又可以分为间期 (interphase) 和有丝分裂期 (M phase), 细胞间期又常划分为休眠期 (G0), DNA 合成前期 (G1), DNA 合成期 (S), DNA 合成后期 (G2), 整个周期可表示为 $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$ 。DNA 周期检测可用来反应细胞周期的各个期的状况, 即细胞增殖状况。

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, 利用细胞内 DNA 能够和荧光染料 (如碘化丙啶--PI) 结合的特性, 细胞各个时期其 DNA 含量不同从而结合的荧光染料不同, 流式细胞仪检测的荧光强度也不一样 (如下图所示)。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。

PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535nm, 最大发射波长为 615nm, PI 的红色荧光在 FL2 或 FL3 通道检测 (通常检测通道为: 488nm 激发; 583nm 检测)。

每个样采集 20000~30000events。本试剂盒经过优化的配方，可获得绝佳的周期结果，可应用于培养细胞（悬浮、贴壁）的 DNA 含量（细胞周期）检测。



注意：自备 75%乙醇

操作步骤

1. 细胞周期检测需要细胞量大，通常使用 6 孔板以上的培养器皿进行检测（视细胞密度，约 1×10^6 个 cells）。

贴壁细胞：从培养板中将培养基吸除，PBS 溶液清洗 3 次，加入 200 μ l 胰酶消化至单细胞悬液（可轻轻吹打），加入 1 ml PBS 终止消化，吹打细胞成单细胞悬液。悬浮细胞：可直接离心进行后续操作。

2. 2000 rpm (300g)，离心 10 min，弃上清（采用吸取方式，防止细胞丢失）。

3. 加入 1 ml PBS，轻轻吹打使细胞悬浮，2000 rpm (300g)，离心 10 min，弃上清（采用吸取方式，防止细胞丢失）。

4. 加入 500 μ l PBS 重悬细胞, 吹打细胞至单细胞悬液。将细胞逐滴加入到 10 ml 冰冷 75% 乙醇中 (事先冻存于 -20°C), 旋涡混合仪上迅速混合均匀, 4°C 固定 $>2\text{h}$ (通常过夜), 固定的细胞可于 -20°C 保存 1 个月。
5. 2000 rpm (300g), 离心 10 min, 完全弃上清 (采用吸取方式, 防止细胞丢失), 用 200 μ l 吸头尽可能多的吸除残留乙醇。
6. 直接使用 0.5 ml PI Staining Buffer (确认已经加入 Rnase A) 重悬细胞, 使用 PI Staining Buffer 调整细胞浓度至 $0.5\sim 1\times 10^6$ 个/ml。
7. 室温避光孵育 15~20 min 后进行检测 (细胞孵育时间不要超过 1h)。
8. 使用 FL2 通道检测, 收集 20000~30000 events。FL2 使用 Lin 参数收集信号, FL2-W/FL2-A, 进行圈门排除粘连体细胞。试验结束后, 使用 Flowjo 或 ModFit 软件进行拟合和数据分析。通常使用该试剂盒可以获得绝佳的结果 (CV 极小)。

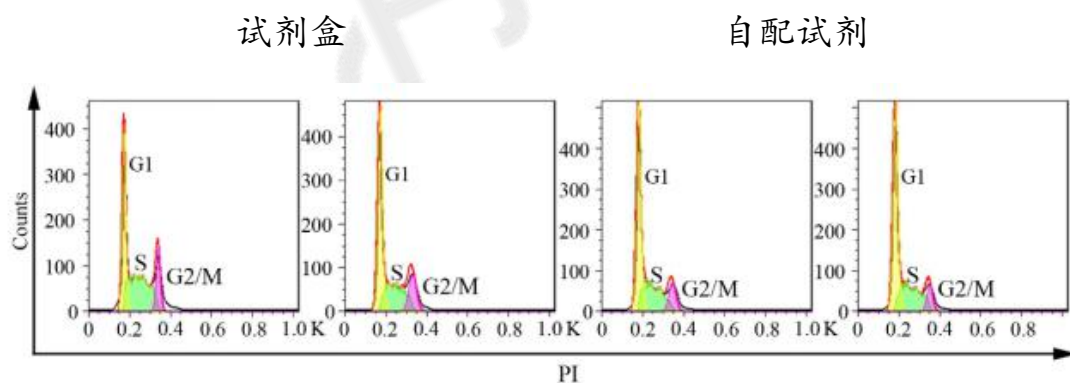


Fig1. 比较 Superbrilliant™ Cell Cycle Detection Kit 和自配试剂。自配试剂将细胞在 37°C 下用 0.025 mg / mL 的碘化丙啶 (PI) 在避光染色 0.5 小时。然后用 BD FACS Calibur 流式细胞仪 (BD, Franklin Lakes, NJ), Cell Quest 和 MODFIT 计算机程序 (BD) 进行分析。