



细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书

货号: WGD-X-3100147

一 产品介绍

本司生产的细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒采用经典的碘化丙啶(PI)染色方法对细胞周期与细胞凋亡进行分析。PI 是一种细胞核荧光染料, 其对碱基几乎没有序列偏好, 因此能够随机嵌入到双链 DNA 或 RNA 碱基之间, 在一定波长的激发光下释放红色荧光, 荧光强度与核酸含量呈线性正相关。

在细胞周期的不同阶段, DNA 含量存在较大差异。以二倍体细胞为例, G0/G1 期细胞的 DNA 含量为 2N, 正在进行 DNA 复制的 S 期细胞的 DNA 含量为 2N~4N 之间, G2/M 期细胞的 DNA 含量为 4N。凋亡细胞由于细胞核发生浓缩导致部分基因组 DNA 片断丢失, 因此 DNA 含量明显低于 2N, 在流式检测荧光图上出现所谓的 sub-G1 峰, 即凋亡细胞峰。

本试剂基于该检测原理, 通过流式细胞仪分析 PI 与 DNA 结合后产生的荧光强度变化区分细胞周期的各个阶段。

本试剂盒适用于贴壁或悬浮细胞的细胞周期与细胞凋亡检测。如果检测目标为组织, 则必须把组织消化至单细胞状态, 才可以进行检测。

本试剂盒足够用于 50 次检测。每次检测的细胞数量可以为 10~100 万。

二 产品目录

产品名称	规格
细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	50 rxns

三 产品组成

组分	50 rxns
PI 染色液 (1×)	50 mL
细胞膜通透剂	250 μL

四 产品用途

本产品适用于绝大多数可进行有丝分裂的真核细胞的细胞周期与细胞凋亡检测。

五 产品特点

1. 操作简便: 试剂盒提供 PI 染色预混液(1×), 减少操作步骤, 最快 50min 获取实验结果。
2. 结果准确: 特异性结合 DNA, 排除 RNA 干扰, 确保 G0/G1、S、G2/M 期分群清晰。
3. 适用性广: 适用于检测大多数可进行有丝分裂的真核细胞, 适配基础研究、药物开发以及临床前研究等场景。
4. 高效双检测: 单次实验即可完成细胞周期和细胞凋亡检测。

六 注意事项

1. PI 易发生荧光淬灭, 添加 PI 染色液(1×)时应尽量避免操作。
2. 处理细胞时避免使用高浓度胰酶 (如 0.25%) 或含强螯合剂 (如高浓度 EDTA) 的消化液, 不可过度消化与过度吹打, 离心转速不能过高, 防止人为加剧细胞损伤。
3. 若需对细胞进行固定, 请按照说明书提供的方法操作, 确保制备成单细胞悬液。
4. 使用流式细胞仪检测时, 进样速度设置为低速 (约 14 μL/min)。
5. 使用前确保试剂完全溶解并涡旋混匀。
6. PI 是已知的诱变剂, 属于潜在致癌物, 因此 PI 溶液在丢弃之前需要先经过活性炭处理。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并佩戴口罩与一次性手套操作。



8. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

I 操作步骤

1. 准备实验材料：

胰酶（含 EDTA $\leq$ 0.05%）、预冷 1×PBS、预冷无水乙醇。

2. 流式细胞仪检测：

2.1 细胞培养

取对数生长期细胞接种于培养皿中，培养至正常生长阶段。

注：根据实验需要，可选择合适的药物处理细胞，构建试验模型。

2.2 细胞处理

a. 贴壁细胞：轻柔吸除细胞培养液，加入 1×PBS 润洗 1 次，吸除 1×PBS 后加入胰酶溶液（含 EDTA $\leq$ 0.05%）消化细胞，完成消化后加入含血清的完全培养基终止消化，轻柔吹打，制备成单细胞悬液。500×g 离心 5 min，弃上清，获下层细胞沉淀。

b. 悬浮细胞：500×g 离心 5 min，小心吸除上清。加入 1×PBS 重悬细胞，再次离心，弃上清，获下层细胞沉淀。

c. 组织细胞：将组织块剪成小碎块，加入胰酶（含 EDTA $\leq$ 0.05%）消化 0.5~1 小时，经 200~400 目筛网过滤后可得到单细胞悬液。500×g 离心 5 min，弃上清，获下层细胞沉淀。

注：若组织块消化困难，可加入适量胶原酶。

2.3 若当天可进行样本检测，选择步骤 2.4；

若收取样本后无法当天检测，选择步骤 2.5。

2.4 未固定样本细胞周期与细胞凋亡检测

a. 洗涤：加入 1×PBS 重悬细胞沉淀，细胞计数。500×g 离心 5 min，弃上清，收集下层细胞沉淀。

b. 染色：向 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞中加入 1 mL PI 染色液 (1×)，再加入 5 μ L 细胞膜通透剂，轻柔吹打混匀后，于 37℃ 下避光孵育 0.5~1 小时。

注：PI 染色液 (1×) 内已添加适量 RNase A，可去除细胞中 RNA 干扰，检测时无需重复添加。

c. （可选）洗涤：500×g 离心 5 min，弃上层染色液。加入 1×PBS 重悬细胞，再次离心，弃上清。再次加入 1×PBS 重悬。

d. 检测：流式细胞仪在 488 nm 激发波长处检测红色荧光，也可同时选择检测光散射情况。

注：（1）染色完成后，建议立即检测。若条件限制，可于 4℃ 避光保存待测，尽量在 24 小时内完成检测。

（2）流式细胞仪检测时，进样速度设置为低速（约 14 μ L/min）。

2.5 固定样本细胞周期与细胞凋亡检测

a. 洗涤：加入 1×PBS 重悬细胞沉淀，细胞计数。500×g 离心 5 min，弃上清，收集下层细胞沉淀。

注：可留取少量上清，避免误吸，造成样本损失。

b. 固定：加入适量 1×PBS 重悬细胞沉淀，轻柔吹打混匀，边涡旋边逐滴加入 3 倍体积预冷的无水乙醇，使其终浓度为 75%。

注：（1）为确保制备成单细胞悬液，请务必按照该步骤对细胞进行固定。

（2）固定时需逐滴滴加预冷后的无水乙醇，不可配置成 75% 乙醇后再加入到细胞沉淀中。

（3）固定液的终体积根据细胞数量来添加，1 mL 75% 乙醇大约可固定 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞，超过此范围需适当增加固定液体积，避免固定不充分。

c. 4℃ 固定 2 小时以上，或 -20℃ 过夜。

注：4℃ 固定时间不宜超过 24 小时，避免细胞破碎。

d. 洗涤：500×g 离心 5 min，弃上清。加入 1×PBS 重悬细胞，再次离心，弃上清。

e. 染色：向 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞中加入 1 mL PI 染色液 (1×)，轻柔吹打混匀后，于 37℃ 下避光孵育 0.5~1 小时。



注：PI 染色液 (1×)内已添加适量 RNase A，可去除细胞中 RNA 干扰，检测时无需重复添加。

f. （可选）洗涤：500×g 离心 5 min，弃上层染色液。加入 1×PBS 重悬细胞，再次离心，弃上清。再次加入 1×PBS 重悬。

g. 检测：流式细胞仪在 488 nm 激发波长处检测红色荧光，也可同时选择检测光散射情况。

注：流式细胞仪检测时，进样速度设置为低速（约 14 μL/min）。

■ 储存及运输条件

2 ~ 8℃避光保存 12 个月，冰袋运输。

■ 常见问题及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
流式检测中出现高比例 sub-G1 峰	胰酶浓度过高（>0.25%）	建议改用含 0.02% EDTA 的 0.05%胰酶，或使用 1×PBS 将胰酶溶液(0.25%)[(+EDTA)][(-)酚红]稀释 5 倍
	消化时间过长（>3 分钟）	消化时间控制在 1~2 分钟
	剧烈吹打导致 DNA 断裂	使用温和消化酶（如 Accutase）或机械刮取法
细胞聚集、峰型拖尾或 CV 值>8%	乙醇固定时未逐滴加入，导致细胞成团	固定时边加冷乙醇边涡旋混匀
	固定时间不足（<2 小时）	4℃过夜固定
	固定后未充分洗涤，存在乙醇残留	固定后增加洗涤次数
G0/G1 峰位置偏移或出现双峰	仪器未校准（电压或补偿设置错误）	标准微球重新校准流式细胞仪（调整 FL2/FL3 电压）
	样本中存在多倍体细胞或不同细胞系混合	检查细胞来源是否纯化，排除污染
进样速度骤降或报警	细胞未充分分散	使用 200~400 目筛网过滤后再上样检测
软件拟合显示 S 期 <5%（与实际增殖状态不符）	RNase A 活性不足，残留 RNA 干扰 PI 与 DNA 结合	RNase A 活性不足，可自行添加少量 100 μg/mL RNase A
	细胞生长密度过大，存在接触抑制	检测前确保细胞密度在 60~70%汇合度
G2/M 峰与 G0/G1 峰重叠或缺失	细胞周期阻滞（如接触抑制或药物处理）	检测前确保细胞密度在 60~70%汇合度，并使用细胞周期同步化对照（如 Nocodazole 阻断 G2/M 期）
	染色时间不足	延长染色时间，确保大于 30 分钟
周期拟合失败	细胞数量过少/状态较差	增加细胞数量，减少操作过程中的细胞损耗
	拟合模型不匹配	更换拟合模型，Waston/Dean-Jett-Fox
	通道不匹配	选择正确的通道：PE/FL2