

碘化丙啶 PI 染色液(50ug/ml)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

碘化丙啶染色(PI stain)可以对细胞周期与细胞凋亡进行分析。碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种可以嵌合到双链 DNA 和 RNA 的碱基对中并与之结合的荧光染料，无碱基特异性。碘化丙啶与双链 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 Propidium Iodide 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的分析。

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 片断在染色过程中丢失，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。

细胞凋亡时，流式细胞检测可呈现亚二倍体核型的特征，根据光散射的特点，PI 染色可以区分细胞凋亡和细胞坏死的细胞峰型。细胞凋亡时，出现凋亡细胞皱缩、染色质浓缩、核碎裂，产生凋亡小体，使细胞的前向光散射低于正常。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。细胞坏死时细胞多表现为细胞肿胀，因此前向光散射高于正常，对侧向光散射高于正常。

碘化丙啶 PI 染色液(50 μg/ml)主要由 PI、破膜剂等组成，经常用于培养的贴壁或悬浮细胞的细胞周期与细胞凋亡检测，亦可用于区分细胞凋亡和细胞坏死。PI 染色液工作浓度为 20~50 μg/ml，不含 RNase，推荐用于 RNA 染色，细胞检测含量范围一般为 0.1~1×10⁶ 之间。

操作步骤(仅供参考)：

1、细胞样品的制备：

(1)贴壁细胞：

小心收集细胞培养液到一个无菌离心管内备用。

用胰蛋白酶消化细胞至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。

收集上述细胞悬液到离心管内。

4℃, 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50 μl 培养液, 以免吸走细胞。

加入约 1ml 提前预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移至 1.5ml 无菌离心管。

4℃, 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。

小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50 μl PBS, 以免吸走细胞。

轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。

(2)悬浮细胞:

4℃, 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。

小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50 μl 培养液, 以免吸走细胞。

加入约 1ml 提前预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移至 1.5ml 无菌离心管。

4℃, 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。

小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50 μl PBS, 以免吸走细胞。

轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。

2、细胞的固定: 加入 1ml 冰浴预冷 70%乙醇中, 轻轻吹打混匀, 4℃条件下固定 2h 或更长时间。4℃固定 12~24h 可能效果更佳。

3、细胞的清洗:

4℃, 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。

小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50 μl 溶液, 以免吸走细胞。

加入约 1ml 提前预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移至 1.5ml 无菌离心管。

4℃, 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。

小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50 μl PBS, 以免吸走细胞。

轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。

PI 染色: 在每个待检细胞样品中加入 500 μl 配制好的 PI 染色工作液, 轻轻重悬细胞沉淀, 置于 37℃避光水浴 30min。在 24h 内进行染色或流式细胞仪分析。

5、检测与分析: 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 或 RNA 含量分析和光散射分析。

染色结果: 凋亡细胞 G1 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型, 在光散射谱上, 前向光散射低于正常, 侧向光散射高于正常。

注意事项:

荧光染料都存在淬灭的问题, 建议染色后尽快检测。

为减缓荧光淬灭可以使用抗荧光淬灭封片液。

在为了获得细胞沉淀的离心的过程中, 对于特殊细胞, 如果细胞沉淀不充分, 可以适当提高离心力或延长离心时间。

如果用于组织的细胞周期与细胞凋亡检测, 则必须把组织消化后, 制备成单细胞悬液, 才可以进行检测。

细胞凋亡时, 凋亡细胞的标志之一是 DNA 可染行降低, 但这种情况并不是完全的, DNA 含量的降低或者 DNA 与染料结合能力下降也会导致 DNA 可染行降低, 在分析的时候应特别注意。PI 对人体有刺激性, 请注意适当防护。

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。