细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

货号: KTA2021　　规格：50 T/100 T　　批号：见产品标签

	应用实验：适用细胞的流式细胞术
	荧光激发/发射波长：Cycle Green Reagent: Ex/Em=502/525 nm
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）是通过检测 DNA 含量分析细胞周期和细胞凋亡的试剂盒。Cycle Green Reagent 跟核酸结合后荧光强度（Ex /Em : 502 /525 nm）得到 500 倍增强，灵敏度高，且荧光强度跟核酸含量成正比。细胞经 Cycle Green Reagent 染色后，假设 G0/G1 期细胞荧光强度为 1，则含有双份 DNA 的 G2/M 期细胞的荧光强度理论值为 2，而处于 DNA 复制的 S 期细胞的荧光强度为 1-2 之间。晚期凋亡或坏死细胞由于细胞核皱缩，DNA 片段化导致部分基因组 DNA 丢失，所以荧光强度小于 1，流式分析中会出现 sub-G1 峰，即凋亡峰。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	50 T	100 T	
Cycle Green Reagent (1000×)	25 μL	50 μL	-20℃，避光保存
RNase A (100×)	250 μL	500 μL	-20℃

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	流式细胞仪	FITC 通道
耗材	流式管	/
试剂	无水乙醇，PBS	至少提前一晚预冷
其他	离心机	/

04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Cycle Green Reagent (1000×)	即用型	避光保存
RNase A	即用型	根据实际用量

05-2 实验步骤

实验前准备：建议将无水乙醇提前放置-20℃至少一晚，及准备 4℃预冷的 PBS

1. 根据实验目的处理细胞；

2. 收集单细胞悬液（建议不低于 1×10^6 个细胞）：对于非贴壁细胞，直接收集细胞悬液进行离心；对于贴壁细胞，需使用胰蛋白酶消化成单细胞（推荐使用温和消化液），然后离心（离心速度根据细胞大小而定），弃上清；

3. 用预冷的 PBS 洗涤细胞沉淀两次；

4. 最后一次清洗离心后，弃上清，加入合适体积的预冷 PBS（比如加入 0.3 mL PBS，后期则要加 0.7 mL 无水乙醇进行固定，使得乙醇最终固定浓度为 70%）重悬细胞，然后将细胞管转移至冰上；

5. 然后缓慢加入预冷的无水乙醇至乙醇终浓度 70%，边加边混匀（避免局部乙醇浓度过高产生多聚体），将细胞转移到-20℃保存 2 h 或更长时间（建议过夜固定 12-24 h）；进行染色之前，这些细胞可以在-20℃下保存数周；

注意：在固定过程中，细胞可能会聚集。缓慢加入无水乙醇，同时轻轻涡旋有助于防止细胞聚集；

6. 4℃，300 g 离心 5 min；

7. 除去乙醇，并将细胞重悬于 1 mL 冰冷的 PBS 中；

8. 4℃，1000 g 离心细胞 5 min，然后弃上清，重复清洗一次；

9. 将细胞重悬于 0.5 mL PBS 中，加入 5 μL RNase A 混匀，放 37℃孵育 0.5 h；

10. 加入 0.5 μL Cycle Green Reagent (1000×)并避光在冰上孵育 30 min 到 2h；

11. 通过流式细胞仪检测细胞（建议 24 h 内上机）。

注意：

1. 乙醇固定后加入 PBS 离心清洗过程中细胞极易损失，可以用水平离心机并增加离心速度，另增加始细胞量也可减少损失。

2. 细胞培养时不要长得太满，可以维持 70%~80%密度，使得细胞处于增长期，有一定比例的 S 和 G2 期。细胞上机前可以进行过滤，采集时可以用低速采集，这样可以使得收集的细胞尽可能是单个细胞，如果因样本等原因无法避免产生多聚体，可以在细胞圈门时剔除掉该部分细胞。

06 结果展示

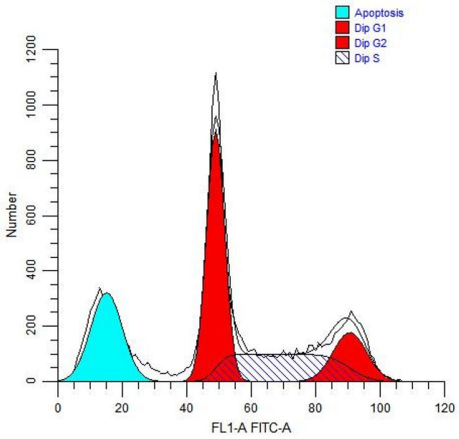


Figure 1. Hela 细胞经凋亡诱导剂处理后，经细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）进行染色，用 Beckman Coulter CytoFLEX 检测（FITC 通道），然后周期拟合分析。

07 FAQ

1. 做细胞周期时，拟合效果不理想，或没有明显的 G2 峰，该如何解决?

细胞是否有明显的 G2 峰，跟细胞的增殖能力有关，比如细胞生长太密没有足够的营养增殖能力降低，G2/M 期细胞少，G2 峰自然不明显，另外一些药物刺激后也会导致细胞增殖降低，没有明显的 G2 峰，需要优化实验条件（比如降低药物浓度或缩短处理时间）或降低 G2/G1 比值可以达到拟合的效果。另外上机检测时也要注意是否超出流式细胞仪的检测上限，通过调增溢或电压使得检测信号在仪器的合理线性范围内，或者根据细胞量调整染色液浓度。

2. 当细胞采集时存在一定比例的粘连体，如何对数据进行分析?

在圈出细胞后，一般会用检测通道的 A 和 H 进行二维坐标圈门，比如横坐标为 FITC-A，纵坐标为 FITC-H（注意坐标轴都要更换为线性 liner），然后沿 45°角圈出左上角的细胞即为单细胞，再进行后面的周期拟合分析。

08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA2020	细胞周期染色分析试剂盒（PI）
KTA2031	EdU 法细胞增殖成像分析试剂盒（橙色荧光）
KTA4001	线粒体膜电位分析试剂盒（JC-1 法）

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

（Abbkine 货号：KTA2021）

样本处理



用所需方法处理细胞



4℃，300 g离心5 min；收集细胞
用预冷的PBS洗涤
再次离心，去上清，将细胞管转移至冰上



预冷的70%乙醇缓慢重悬细胞



细胞在-20℃下放置2 h
或
过夜固定12-24 h



①.4℃，1000 g离心5 min，除去乙醇
使用1 mL预冷PBS重悬细胞；
②.4℃，500 g离心细胞10 min，除去PBS
重复①、②步骤



0.5 mL PBS重悬细胞，加入5 μL
RNase A，37℃孵育30 min



加入0.5 μL Cycle Green Reagent
(1000×)，冰上避光孵育30 min-2 h



流式细胞仪分析
(FITC)

V1.0