组织中的细胞周期和凋亡检测方法之一－－－PI 法

schoman

无论是肿瘤或其它正常新鲜组织均可用 PI（碘化丙啶）的方法来检测，这是一种常见而且便宜的方法。主要操作步骤如下：

1、组织块用 0.25%胰酶消化 30min－1h。

2、200－400 目筛网过滤细胞，获得单细胞悬液。

3、75％乙醇（－20 度预冷）固定细胞 1h。

4、加入 PI（终浓度 50ug／ml）和无 DNA 酶污染的 RNA 酶（终浓度 50ug／ml）1ml 染色 30min－1h。

5、流式细胞仪检测细胞周期和凋亡。

注意事项：

1、组织消化后使细胞形成单个细胞悬液是本检测方法的关键。如组织难以消化，可加入适量胶原酶。另外，消化前，用剪刀将组织剪成小块也不要忘了。

2、细胞可尽量的多准备（at least 100 thousand），这样流式检测方便，结果可靠。

3、每次消化的时间等条件应尽量一致，否则使实验结果 CV 值偏大。

4、细胞用乙醇固定后可以访置 48 小时（4 度保存）后检测，便于无法立即检测的实验者，对实验结果基本没有影响。

其它也有一些检测凋亡的方法，均有商品化试剂盒。在此不赘述。

yanzishenyang：我看相关的说明：碘化丙啶（propidium iodide,PI）检测 早期死亡细胞膜通透性状态的不同是区分细胞凋亡和坏死的一个重要指标，凋亡细胞在进入最终溶解阶段前，胞膜通透性无明显改变，相对分子质量大的与 DNA 结合的荧光染料（如 PI）不能时入凋亡细胞内，而相对分子质量小的荧光染料（如 Hoechest 3342 或 33258 等）仍能被细胞摄取。应用流式细胞仪或荧光显微镜可区分和坏死细胞，细胞内 DNA 出现 Hoechest 3342 标记而不出现 PI 标记的为凋亡细胞。

偶得细胞是用 PI 染色的，经过流氏细胞仪检测出现一个亚二倍体峰，是否能和坏死区别？因为偶用的作用细胞的蛋白本身可以造成细胞膜的损伤，所以 PI 可以进入细胞，这是否意味着我检测的结果无法区分凋亡和坏死？

hdhdhd0000：用 PI 法识别凋亡时，有一种方法叫 SUB-G1 法，这种方法需要在染 PI 前加入适量的破膜剂（磷酸盐－枸橼酸盐缓冲盐），我们称之为 PC 液，它会让晚期凋亡所形成的 DNA 小碎片部分出膜而使胞内的 DNA 总含量减少，从而使流式上的 DNA 直方图的 G0/G1 峰前出现一个亚二倍体峰，也就是 SUB－G1 峰（凋亡峰）！

用荧光 2 的面积做直方图可以清楚的看见凋亡峰，但是要区分 APo 和 Nec 需要少量的经验，而在荧光 2 高度图上，因为是用的是对数，所以可以把凋亡和坏死拉开，凋亡峰在不同的细胞周期特异性细胞凋亡时，都特异性的出现在 10 的 2 次方荧光道数处，坏死在 10 的 1 次方处，从而可以清楚的分清它们。

核染色剂（核染料）

yuanaiyu：用流式细胞仪测脑组织细胞悬液中细胞线粒体的膜电位，需先将细胞与细胞碎片区分开来，现考虑用一种亲细胞核的染料将细胞分选出来，已尝试用过 PI，但 pI 分子量大，过分破坏细胞膜而影响了线粒体膜电位。请问有没有一种小分子的核染料，既能进入细胞核又对对细胞膜的影响很小？何处能买到？

shaman3: 常用的 DNA 特异性染料有：HO 33342 (Hoechst 33342)，HO 33258 (Hoechst 33258)，DAPI4（6-diamidino 2-phenyl-indole dihydrochloride）。三种染料与 DNA 的结合是非嵌入式的，主要结合在 DNA 的 A-T 碱基区。紫外光激发时发射明亮的蓝色荧光。
Hoechst 是与 DNA 特异结合的活性染料，储存液用蒸馏水配成 1mg/ml 的浓度，使用时用 PBS 稀释成终浓度为 2~5mg/ml。
DAPI 为半通透性，用于常规固定细胞的染色。储存液用蒸馏水配成 1mg/ml 的浓度，使用终浓度一般为 0.5 ~1mg/ml。
至于什么地方能买到，DAPI 常用在免疫荧光中，各大试剂公司都可订到，本人比较偏于 DAPI，就是因为用过后发现它将细胞核染得很漂亮，如图（自己做的）：
flyingrisker: 流式本身就有区别细胞和细胞碎片的功能的呀。只要你在选要分析的细胞群落的时候，只选相对比较密集的细胞区域，就可以把碎片的感染去掉了。
你如果一定要用核染料，我觉得 Hoechst33258 不能用，因为它是紫外激发的，可能会对你的细胞线粒体膜电位有影响。
至于核染色的漂亮与否，大家可以比较一下。这是我用 Hoechst33258 染的细胞核，如图

PI 的配置

deardeer：PI 怎样配制？怎样保存？有的文献说要用柠檬酸钠溶解，这对实验有影响吗？如果不这样，那直接加入而不用柠檬酸钠溶解可以吗？
hinavy：PI 配制 I 15mg，枸缘酸钠 0.1g，NP-40 0.3ml，加蒸馏水至 100ml，4 度避光保存
sunandsuny：也有的直接用 PBS 配的，也有的用 1.0%Triton-X100*0.9%NaCL 配的，浓度都是 1mg/ml.
andywang：我用来做流式的 PI 配制方法是：5mg PI +0.1ml Triton X-100 +3.7mg EDTA +10ml PBS，4 度避光保存。为储存液，用时稀释 10 倍。
PI 染液配方，用于 DNA 倍体检测
hawaii_flyer：请大侠给个 PI 染液配方，用于 DNA 倍体检测
cells：一般好象有两个浓度。可购自 PHARMAGIN 或 SIGMA。
1、 比如用流式细胞仪测定神经细胞凋亡取缺氧-复氧培养各组海马神经元，用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化(37℃、30 min)分散，置于 4℃冷乙醇中固定后，在 1×109 个细胞/L 密度的细胞悬液中加入 1 ml 碘化丙啶(PI)染液(100mg/L)，4℃染色 30 min，用 FACS 流式细胞仪测定荧光强度，激发波长 488 nm，每次测定 106 个细胞。采用 Modfit 分析软件进行细胞 DNA 含量分析，低于 G1 期二倍体 DNA 含量的细胞为凋亡细胞。
2、 FACS 检测凋亡细胞的亚二倍体 DNA. 新鲜小鼠胸腺细胞细胞加入 75％乙醇过夜，次日用 PBS 洗 2 次，加入 PI(碘化丙啶)低渗染液(50 μ g/mL PI，0.1%柠檬酸钠，0.1% Triton X-100)，以 FACS 检测细胞核 DNA 中亚二倍体的凋亡 DNA 波峰.
1）冰乙醇固定后无需穿孔？
2）低渗 PI 染液中 Triton 用量是多少？有的是 100 染液中用 1％Triton 0.5ml。对吗？
3）配方：
柠檬酸三钠　　　0.25g

Triton-X 100 0.75ml
Propidium iodide 0.025g
核糖核酸酶 0.005g
蒸馏水 250ml

PI 染色的剂量问题

midas：我要用 PI 染色培养的细胞，科里的 PI 浓度是 50ug/ml，但是这是染组织切片用的，但是我要用它来染细胞，不知此时 PI 的应用浓度是多少，

jmtang：流式细胞仪 PI 染色死细胞方法 。PI 能够插入双链 DNA 中。它被活细胞排斥但能穿透正在死亡或已经死亡的细胞的细胞膜。

Ⅰ、材料

1、PI（e.g.,Cat #537059,Calbiochem,San Diego,CA）

2、缓冲体系：1×PBS(Ca2+ and Mg2+ free,e.g.,Cat#9240,Irvine Scientific,Santa Ana,CA)+2%新鲜小牛血清＋0.1%叠氮钠

A、PI 缓冲液 ：用缓冲液将 PI 溶解至终浓度为 1mg/ml 中，于 4℃下密封避光保存 1 个月。

B、PI 浓缩液 ：用缓冲液将 PI 溶解至终浓度为 500mg/ml，于 4℃下密封避光保存。我们已经检测过将 PI 浓缩液放置数月后，并无观察到染色活性的丢失。

Ⅱ、方法： 将样品细胞按程序描述的方法用 FITC 标记的单克隆抗体进行单色染色。

A、在最后的洗涤步骤后，将样品细胞悬浮于 PI 缓冲液中，于 4℃下密封避光保存以备通过流式细胞仪分析；

B、在最后的洗涤步骤后，如前述将样品细胞悬浮后备用。如果您想检测样品细胞活力，在每一管中加入 2μ l 的 PI 浓缩液，混匀。将样品置于 4℃下密封避光保存以备流式细胞仪分析。

注意：此法并不适用于甲醛固定的样品。在根据 Sasaki 等人的方法（Cytometry 8:413,1987）用 PE 标记的抗体对样品进行染色时可以适用此方法。然而，由于 PI 和 PE 的发射光谱的广泛交迭，因此本方法适于用 7-氨基-放线菌素 D 将死细胞加以区分。

midas：昨天用 PI 染色出现灾难性后果，加入 PI 后，细胞全部脱壁、死亡，荧光下看一片红色，可惜我养了好久的细胞一下子就完蛋了！ 分析原因，我用的 PI 本来是用于然组织片的，为了增加膜的通透性，里面加了 triton-X 100，这可能就是给我细胞带来灾难后果的原因，所以再次提醒自己：做细胞染色以及电镜时，一定不能加 triton。 一切都要重来！ 再次请教：

1、配 PI 的 PBS 的浓度是多少？

2、做细胞染色 PI 的应用浓度（培养液中的终浓度）是多少？

Huolj8：我染细胞 PI 用 10ug/ml ，这是终浓度。

midas：用于配制 PI 的 PBS 浓度是 0.01mM 吗？

Huolj8：PBS 是一种缓冲液，其成分包括 NACL，KCL，等。好象不能用多少 mM 算吧。

PBS:1000ml

KCL:0.2g

NaCl:8g

Na2HPO4:1.15g or:Na2HPO4.12H2O:2.9g

KH2PO4:0.2

schover：用 PI 染色来区分死细胞和活细胞,浓度可以从 5ug~20ug，我都试过，都可以，至于 PBS 没有什么特殊要求，只要是能够满足细胞培养即可。用 Hank's 液、生理盐水也可以代替。

碘化丙啶（PI）有没有毒

guagua：我要做细胞荧光染色了，要用碘化丙啶（PI），与 PI 分子结构类似的 EB（溴化乙啶）是强致癌剂，PI 致癌性如何啊？

gy：有毒的，荧光染料，染 DNA 的试剂都有毒的

Fang CY：对每一个爱惜生命的人，发出如此只问是可以理解的。但也相信提这样问题的人都是些刚进实验室的新手。他们对一切充满了好奇,对一切所谓有毒，有害的事情又充满了恐惧。他们总是希望收获好东西,而让坏东西离自己远远的。但这样的事情很难两全其美。要收获，就要付出，当然并不是要一定付出生命代价。在实验室里，有太多的东西都是所谓的有害，有毒的，要想完全避开它们是不可能的，因此，有两点要做到：1. 适当注意防护，如戴手套，口罩等，有很多人平时实验时不传隔离衣，(包括老外，例如我们研究所，平时根本看不到有人穿)，但在某些特定实验下，还是要穿的。2.克服心里障碍，这是最重要的一点。如果在实验时，心里总是想者接触的试剂如何有毒，不但实验做不好，很可能会产生某些对身体的伤害,而这些伤害不是由於试剂本身的毒性导致而是由於心里因素导致。我现在有一同事，由於对同位素恐惧，一到同位素实验室便大汗淋漓，腿脚发软！而一接触到病毒，就要再三的用酒精擦手，洗多次手。虽然这样做可以理解，但我认为还是心里不健康的反映。我在北京疾病控制中心研究 HIV 时，刚开始也是非常紧张，但两周后，一切都变了。原先听一个在此工作过的同学讲，接触活 HIV 的人在进入 P3 实验实时，穿戴的象太空人。可实际情况并非如此，只不过戴普通手套，套袖和隔离衣罢了。而一旦克服了心里障碍，就不再为此而担惊受怕。

robert1：当然是有毒的，每次使用的时候都要有防护措施，如戴上一次性手套。但毒性不会太强，用不着担心，只要不是直接接触到皮肤或进入消化道就没什么可怕的啦

ＰＩ染色上流式检验细胞增殖

春潮带雨：我用我的药物作用ＰＢＭＣ，希望有抑制其增殖的作用．想用ＰＩ染色在ＦＡＣＳ上检测，请告之具体详细的操作方法，

little_G：ＰＩ染色上流式检验细胞增殖比较容易，主要两个指标：1，增殖指数；2，S 期细胞分数。

一般用 PI 染色需要先把细胞固定或者打孔。比较简单的用 75％酒精固定就可以了。一般固定 1 个小时以上，或者冷藏过夜。

具体方法：收集细胞，离心(转数根据细胞种类和离心机的参数自己摸索)。用 PBS 洗涤 2 次，冷乙醇固定，隔夜。离心除去乙醇，用 PBS 洗涤 2 次，加 RNA 酶 0.5 mL，碘化丙啶（0.5ml）冷暗处染色 30 min。上机检测。用 CELL QUEST 软件分析结果（苹果机自带的软件）。

注：

1、加 RNA 酶用来分解 RNA，防止其干扰，很重要。

2、具体加染色剂的体积也是要根据细胞量以及配置的浓度来确定，需要自己摸索。

春潮带雨：那相关的ＰＩ染色Ｋit 呢，请介绍好吗

little_G：RNA 酶和 PI 自己配就行，试剂盒很贵哦！也可以几个同学合买一小

瓶 PI 和 RNA 酶。
PI 染色后涂片可保存多久
zdwyzhy: 本人想用形态学检测凋亡,方法是用 PI 和 Hoechst 双染后涂片在莹光显微镜下计数，想请教前辈高人，涂片后可保存 多久?
Clifford: 看你是怎么做的了! 我们家领导做的片子可以保存半年!(4 度) 最需要注意的是封片子, 封得好保存的时间就长!
其他
zzzyyy1977: 我想测细胞周期，用 PI 染液。是否一定要用 RNA 酶呢?
qingshi: 是的,毋庸置疑,必须用.因为细胞周期是测 DNA 复制,需用 RNA 酶降解 RNA,防止干扰.

在细胞周期内,DNA 含量随细胞内时相发生周期性变化,正常情况下,大多数细胞处于休止期(Go), G1 期细胞虽有 DNA 合成，但 DNA 含量仍为 2N，为二倍体细胞,;处于活跃的 DNA 合成期(S 期)的细胞 DNA 含量为 2N-4N;正经历细胞分裂(G2/M 期)的细胞含有最大量的 DNA(4N)。细胞经固定后用 PI(Propidium Iodine 碘化丙啶)等荧光染料染色即可上机测定。但标本需先经 RNA 酶处理以排除 RNA 干扰。FCM 可在测量大量细胞(数分钟可测定 105 个细胞)后给出 DNA 分布直方图,正常人外周血 DNA 示意图，图中第一个峰(G1)是 DNA 含量为 2N 的细胞峰， 第二个峰是 DNA 含量为 4N 的细胞峰,两峰之间是 DNA 含量为 2N-4N 的处于活跃的 DNA 合成期(S 期)的细胞。用厂家提供的 Multicycle 软件，计算机可自动计算出 G1%、S+G2M%;如用 DNA/RNA 双参数分析， 可得到 G0:G1%,G0/G1 期 DNA 指数， 如标本中有凋亡细胞,在 G1 峰前会出现一个亚 G1 期峰,软件可自动计算出凋亡细胞的%。

正常人外周血 DNA 示意图(采自 Coulter Training Guide)

DNA 倍体分析的临床有价值的指标是 DNA 非整倍体和/或超二倍体%和四倍体%增高。这些改变是肿瘤细胞的特异性改变,和实体瘤相比, 急性白血病非整倍体发生率较低,约 30～40%。
zzzyyy1977:是看到有的文献上只写上 PBS 洗，冷乙醇固定，再洗，加 PI 染液，上机测。没有用 RAN 酶，我不知道，是不是这步可以省略？如果一定需要，不知道您在哪买的 RNA 酶呢？
olddream520: 其实空气中倒处都有 RNA 酶，如果实验不是要求很高的话可以不用，而且这个东东比较贵，10 mg/ml 大约是 310 左右，只有 1ML，不过应该够用了，所以我建议你先不加试做一下，结果不好再加吧
XTYang: PI 可以同时染 DNA 和 RNA,所以必须用 RNase 把 RNA 水解掉以免干扰结果。
handshealing: 做流式要用 RNAse 的，可以和 PI 一起加，最好在 37 度闭光 30 分钟，这样做出来的结果会很好，至于加多少，一般 500 微升加 10 微克。
zzzyyy1977: 我最近要做线粒体、细胞骨架和核的荧光染色，买的是 mitotraker FM green ,Rhodamine-phalloidin 和 PI,请问可以同时染色吗？
lplc：用 PI 作核的复染剂我感觉不是十分合适，Rhodamine-phalloidin 和 PI 荧光都是红色。
hwb：
1、制备 2×106/ml 细胞悬液：弃细胞原培养液，加入 5mlPBS，吹打成单细胞悬液，200—400 目尼龙筛过滤。（30min）
2、乙醇法固定：将单细胞悬液离心（1000rpm，5min），弃上清液，重悬浮于

1ml 4℃预冷的盐水 G 中，缓慢加入－20℃预冷的 95％乙醇 4ml，使其终浓度为 70％，冰浴 30min。（20min）
3、加 100 5mg/mlRNase 溶液，37℃保温 30min。然后，冰浴终止酶作用。（35min）
4、1000rpm，5min 离心，弃上清。（5min）μ
5、用 3ml PI 染液（50 g/ml）重悬细胞，4℃，避光染 15min。（20min）μ
6、加入 200 l 异硫氰酸荧光素染液（1μg/ml 乙醇溶液），4℃，避光染 10min。（10min）
7、1000rpm，5min 离心，弃上清。再用蒸馏水离心（1000rpm，5min）洗 1 次，悬浮于 2ml 生理盐水中。（15min）
8、进行 FCM 分析。DNA 被 PI 着色，呈红色荧光，蛋白质被 FITC 着色呈绿色荧光。

上面是我的操作步骤。今天上了一次流式，但是 FITC 没有信号，是否我的 FITC 量太少了？在第 5 步之后再加加一步离心去上清怎样？然后再加 FITC，但是 FITC 的浓度如何呢？

midas：可以试一试把 FITC 的加大 10ug/ml 试试！先加 FITC 后加 PI，等全部反应完后，统一一次性离心！

hwb：我加的 200 微升的 FITC 浓度是 20 微克/ml 的，终浓度是 1 微克/ml，您的意思是让我把终浓度提高到 10 微克/毫升？

midas：是的！

shangyan1979：PI 是染死细胞的，我想问，染过的死细胞，是否还能再被染上？

小于：那要看你先用什么染细胞的了，PI 与 DNA 和 RNA 都能结合的。我先用荧光染，然后用 PI 染色是没用问题的。