

## YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1075S	YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒	100次
C1075M	YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒	500次

### 产品简介:

- 碧云天生产的YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒(Apoptosis and Necrosis Detection Kit with YO-PRO-1 and PI), 简称YPI/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒, 是一种基于DNA绿色荧光染料YO-PRO-1 (YPI)和红色荧光染料碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)的双荧光法检测细胞凋亡和坏死的试剂盒。本试剂盒适用于荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪及其它荧光检测系统。
- YO-PRO-1, 又名恶唑黄(Oxazole yellow), 简称YPI, 是一种对正常动物细胞膜没有通透性而对于凋亡细胞的细胞膜有通透性的DNA绿色荧光染料, 常用于细胞凋亡的检测。YO-PRO-1是一种非细胞膜穿透性的并对DNA具有高亲和力的羧花青单体绿色荧光染料, 在没有与DNA结合的时候基本上没有荧光, 而与DNA结合后可以发出明亮的绿色荧光。在细胞凋亡发生时, 细胞膜通透性发生改变, 此时YO-PRO-1可以进入细胞内与DNA结合, 发出明亮的绿色荧光, 因此常使用本荧光染料用于分析和鉴定凋亡细胞。需要注意的是YO-PRO-1也能染色坏死细胞, 因此需要和对坏死细胞特异性荧光染色的PI进行双染才能有效判定细胞凋亡。
- PI, 即碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸红色荧光染料, 只能染色细胞膜完整性丧失的坏死细胞, 并与核酸结合发出明亮的红色荧光。因此, YO-PRO-1与碘化丙啶(PI)联合使用, 可以同时进行凋亡细胞和坏死细胞的检测, 凋亡细胞呈现绿色荧光, 坏死细胞同时呈现红色和绿色荧光阳性, 活细胞很少或几乎没有荧光。
- 细胞死亡包括凋亡(apoptosis)、坏死(necrosis)、焦亡(pyroptosis)等多种形式。其中受调控的细胞死亡被称为程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)。程序性细胞死亡包括凋亡、细胞程序性坏死(programmed necrosis)或坏死性凋亡(necroptosis)和焦亡等。从细胞膜的完整性角度来看, 凋亡的特征是细胞膜的完整性会保留, 而坏死的特征是细胞膜的完整性会丧失。
- 细胞凋亡是生物体发育等生命过程中普遍存在的、由基因决定的细胞主动有序的死亡方式。当细胞遇到内、外环境因子刺激时, 启动基因调控的自杀保护措施, 去除体内非必需细胞或即将发生特化的细胞。在这一过程中, 细胞脱离母体或裂解为若干凋亡小体, 并迅速被巨噬细胞或邻近细胞清除, 不会导致炎症反应, 这是一种由基因控制、高度有序的细胞自主死亡, 包含一系列信号事件组成的通路。细胞凋亡的主要特征包括细胞膜保持完整、细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻(Annexin V染色阳性)、基因组DNA片段化(DNA fragmentation) (即产生DNA ladder并且TUNEL染色阳性)、电镜或荧光染色时细胞核碎裂或致密浓染、Caspase 3等激活、线粒体膜电位下降、细胞色素C从线粒体内释放等。
- 坏死通常被认为是一种偶发性的并且是被动的细胞死亡, 如物理性或化学性的损害因素及缺氧与营养不良等都可以导致细胞坏死。坏死细胞初期细胞膜通透性增高, 致使细胞肿胀, 细胞器变形或肿大, 早期细胞核无明显形态学变化, 最后细胞破裂, 细胞膜丧失完整性, 释放出细胞内容物, 并常引起炎症反应, 但不会出现细胞凋亡或自噬标志物。通常, 凋亡对生命体是有利的, 而坏死很可能是有害甚至是致命的。凋亡的晚期也可以发生继发性坏死(secondary necrosis)。受细胞程序性调控的坏死(programmed necrosis)被称为necroptosis。
- YO-PRO-1与DNA结合后的最大激发光波长为491nm, 最大发射波长为509nm; PI与DNA结合后的最大激发光波长为535nm, 最大发射光波长为617nm。YO-PRO-1、PI与DNA结合后的激发光谱和发射光谱参考图1。

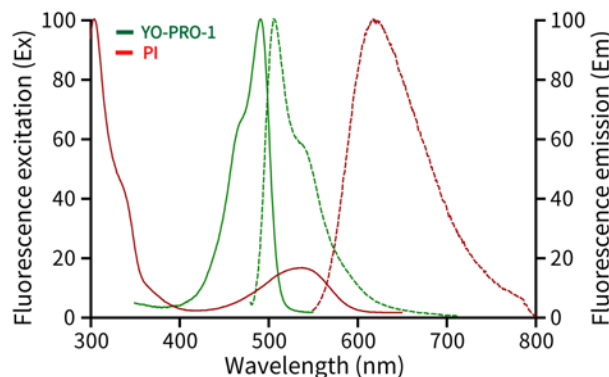


图1. YO-PRO-1、PI与DNA结合后的激发光谱和发射光谱。

- 本试剂盒作为一种细胞凋亡和坏死检测试剂盒, 可以应用于大多数的哺乳动物细胞, 包括贴壁细胞和悬浮细胞, 与传统的Annexin V-FITC/PI检测方法相比, 检测准确性和灵敏度相当。本试剂盒用于检测细胞凋亡与细胞坏死的效果参考图2。

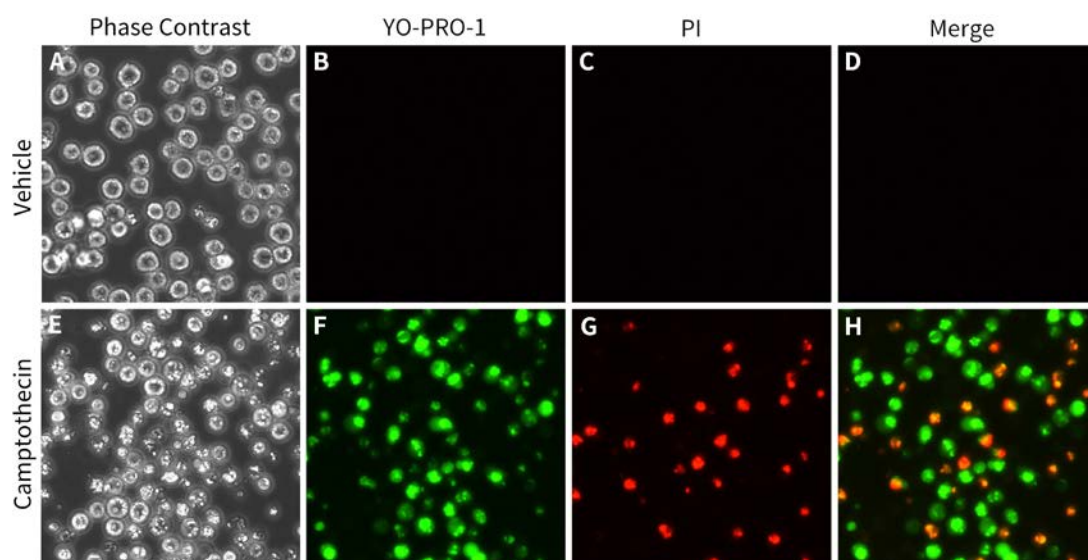


图2. YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒检测MOLM13 (人急性髓原白血病细胞)细胞凋亡与坏死的效果。正常状态的MOLM13细胞在明场下的形态见图A; 正常细胞不会被YO-PRO-1以及PI染色(图B-D)。50 $\mu$ M Camptothecin诱导7小时后的MOLM13细胞在明场下的形态见图E; 此时细胞产生明显的凋亡, 凋亡细胞的细胞核被YO-PRO-1染色为绿色荧光(图F); 坏死细胞的细胞核则同时被YO-PRO-1和PI染色, 红色荧光和绿色荧光重叠呈现橙黄色(图G)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异, 本图仅供参考。

- 本试剂盒提供的YO-PRO-1和PI为1000X溶液, 使用非常便捷。为了得到比较理想的染色结果, 请根据细胞类型和实验实际情况对探针染色液的稀释倍数进行适当调整。YO-PRO-1的工作浓度一般为0.5-5X, 推荐使用浓度为1X; PI的工作浓度为0.1-4X, 推荐使用浓度为1X。同时, 本试剂盒配套提供的检测缓冲液可在一段时间内维持细胞的正常状态, 并给细胞提供一定的营养, 效果通常比PBS或HBSS更好。
- 本试剂盒小包装C1075S和中包装C1075M用于流式细胞仪, 每个样品使用0.5ml的检测工作液, 可以分别进行100次和500次检测; 用于96孔板每孔检测体系的体积为100 $\mu$ l时可以分别可以检测500次和2500次, 检测体系体积为200 $\mu$ l时可以分别可以检测250次和1250次。实际检测次数会因为检测体系的大小和所使用底物浓度的高低而有所不同。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C1075S-1	YP1 (1000X)	50 $\mu$ l
C1075S-2	PI (1000X)	50 $\mu$ l
C1075S-3	检测缓冲液	50ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1075M-1	YP1 (1000X)	250 $\mu$ l
C1075M-2	PI (1000X)	250 $\mu$ l
C1075M-3	检测缓冲液	250ml
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20 $^{\circ}$ C避光保存, 至少1年有效。C1075-3检测缓冲液也可4 $^{\circ}$ C保存。

#### 注意事项:

- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 检测缓冲液应在无菌环境中使用, 否则可能会被微生物污染而影响使用效果, 甚至无法继续使用。
- 两种荧光探针首次使用时, 可以适当分装后在-20 $^{\circ}$ C避光保存, 适当避免反复冻融。
- YP1和PI对人体有刺激性, 操作时请小心, 并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明:

##### 1. YP1/PI检测工作液准备:

- a. **YP1/PI检测工作液的用量**: 对于6、12、24、96孔板, 每孔YP1/PI检测工作液的用量分别为0.5~1ml、200~500 $\mu$ l、100~200 $\mu$ l和50~100 $\mu$ l; 对于流式细胞样品, 每个样品的YP1/PI检测工作液的体积为0.5ml。
- b. **YP1/PI检测工作液的配制**: 根据样品数量和每个样品所需工作液的体积, 计算出YP1/PI检测工作液的总体积。以流式细胞仪检测为例, 每个样品的YP1/PI检测工作液的体积为0.5ml, 参考下表配制YP1/PI检测工作液。

样品数	2	20	200
YP1 (1000X)	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l	100 $\mu$ l
PI (1000X)	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l	100 $\mu$ l
检测缓冲液	998 $\mu$ l	9.98ml	99.8ml
YP1/PI检测工作液	1ml	10ml	100ml

注1: 本试剂盒中提供的检测缓冲液在一段时间内可以维持细胞的正常状态, 并给细胞提供一定的营养, 效果通常比PBS或HBSS更好, 也可以用其它合适的溶液, 如无血清培养液代替。

注2: 检测工作液中的YP1和PI的最终浓度需根据不同细胞系和实验体系通过预实验进行优化。

## 2. 荧光显微镜检测:

- a. **接种培养**. 将细胞接种于96孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上, 按实验设计对细胞进行一定处理。
- b. **洗涤(选做)**. 对于贴壁细胞, 吸除培养液, 用PBS洗涤细胞1次; 对于悬浮细胞, 250-1000 $\times$ g室温离心5min, 吸除上清, 用PBS洗涤1次。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。在能充分吸净残留液体的情况下, 可以不使用PBS洗涤。
- c. **染色**. 加入适当体积的YP1/PI检测工作液。通常96孔板每孔加入100 $\mu$ l, 24孔板每孔加入250 $\mu$ l, 12孔板每孔加入500 $\mu$ l, 6孔板每孔加入1ml。37 $^{\circ}$ C避光孵育5-20min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同, 以5min作为初始孵育时间, 后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化, 以得到更加理想的染色效果。
- d. **检测**. 孵育结束后, 在荧光显微镜下观察荧光染色效果(YP1染色阳性细胞为绿色荧光, Ex/Em=491/509nm; PI染色阳性细胞为红色荧光, Ex/Em=535/617nm)。对于悬浮细胞MOLM13, 本产品的荧光检测效果参考图2。如有需要, 也可进一步进行其它荧光的复染, 例如使用Hoechst 33342活细胞染色液(C1027-C1029)染色细胞核等。注意整个过程均需注意避光操作。

## 3. 流式细胞仪检测:

- a. **细胞准备**. 贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬, 并用PBS洗涤一次; 悬浮细胞250-1000 $\times$ g室温离心5min, 弃上清, 用PBS洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为 $10^6$ 个细胞。
- b. **染色**. 对于上一步骤的 $10^6$ 个细胞的沉淀, 加入0.5ml YP1/PI检测工作液, 重悬为单细胞悬液。37 $^{\circ}$ C避光孵育20min。注: 需要准备好仅含缓冲液的细胞样品用作流式细胞仪检测时的阴性对照, 该缓冲液与配制YP1/PI检测工作液的缓冲液宜保持一致。同时准备两管额外的细胞样品, 每管只加入一种染料(YP1或PI), 用于流式单染的补偿调节。
- c. **检测**. 孵育完成后, 可以直接进行流式细胞仪检测, 也可以250-1000 $\times$ g室温离心5min沉淀细胞, 吸净液体后每个样品加入1ml检测缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪检测(YP1染色阳性细胞为绿色荧光, Ex/Em=491/509nm; PI染色阳性细胞为红色荧光, Ex/Em=535/617nm)。如有需要, 也可进行进一步的染色, 例如使用Hoechst 33342活细胞染色液(C1027-C1029)染色细胞核等。注意整个过程均需注意避光操作。染色后, 将样品置于冰上, 并尽量在1小时内进行流式细胞仪检测和分析。

注1: 使用仅含检测缓冲液的并且未经染色的细胞样品用于流式细胞仪的阴性对照设置。

注2: 细胞圈门(gate)时, 注意不要圈入细胞碎片, 并使用YP1或PI单染的细胞进行调节补偿。双染细胞流式检测应获得两个相对独立的细胞群: 绿色荧光的凋亡细胞群和红色荧光阳性或者红色荧光和绿色荧光双阳性的坏死细胞群。坏死细胞的绿色荧光染色通常会比较弱一些。

注3: 由于流式检测比较灵敏, 使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低, 此时可根据细胞类型和实际染色情况对YP1或PI的稀释倍数进行适当调整。

## 4. 荧光酶标仪检测细胞死活的变化:

- a. **接种培养**. 将细胞接种于96孔板黑色多孔板中, 如BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966), 每孔的细胞数需要控制在100-10,000个, 通常宜在2000-5000个范围内。按实验设计对细胞进行一定处理。
- b. **洗涤(选做)**. 对于贴壁细胞, 吸除培养液, 用PBS洗涤细胞1遍; 对于悬浮细胞, 250-1000 $\times$ g室温离心5min, 吸除上清, 用PBS洗涤1遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。在能充分吸净残留液体的情况下, 可以不使用PBS洗涤。
- c. **染色**. 加入适当体积的YP1/PI检测工作液, 通常96孔板每孔加入100 $\mu$ l。37 $^{\circ}$ C避光孵育5-20min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同, 以5min作为初始孵育时间, 后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化, 以得到更加理想的染色效果。
- d. **检测**. 孵育结束后, 用荧光酶标仪检测(YP1染色阳性细胞为绿色荧光, Ex/Em=491/509nm; PI染色阳性细胞为红色荧光, Ex/Em=535/617nm)。通过对比对照组两种荧光探针的RFU (Relative fluorescence values), 可以得出凋亡细胞与坏死细胞数量的关系。

## 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C1052	细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1053S	7-AAD死细胞检测试剂盒	200次
C1053M	7-AAD死细胞检测试剂盒	1000次
C1056	细胞凋亡与坏死检测试剂盒	100次

C1062S	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1062M	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1062L	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	100次
C1065S	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1065M	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1065L	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	100次
C1067S	Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1067M	Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1069S	Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1069M	Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1069L	Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	100次
C1070S	Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1070M	Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1071S	线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1071M	线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1073S	活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	20次
C1073M	活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	50次
C1077S	活细胞Caspase-3活性与细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1077M	活细胞Caspase-3活性与细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1086	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	20次
C1088	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	50次
C1089	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	20次
C1090	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	50次
C1091	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	20次
C1098	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	50次
C2015M	Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	500次
C2022-0.2ml	YO-PRO-1 (凋亡与坏死细胞绿色荧光探针)	1mM×0.2ml
C2022-1ml	YO-PRO-1 (凋亡与坏死细胞绿色荧光探针)	1mM×1ml
ST511	Propidium Iodide/碘化丙啶	5mg
ST512	Propidium Iodide/碘化丙啶	20mg
ST515-1mg	7-AAD (7-氨基放线菌素D)	1mg
ST1569-10mg	碘化丙啶(≥94.0%, Reagent grade)	10mg
ST1569-50mg	碘化丙啶(≥94.0%, Reagent grade)	50mg
ST1569-250mg	碘化丙啶(≥94.0%, Reagent grade)	250mg

#### 使用本产品的文献：

- Dane Huang, Chao Zhao, Ruyue Li, Bingyi Chen, Yuting Zhang, Zhejun Sun, Junkang Wei, Huihao Zhou, Qiong Gu, Jun Xu. Identification of a binding site on soluble RANKL that can be targeted to inhibit soluble RANK-RANKL interactions and treat osteoporosis. *Nat Commun.* 2022 Sep 12;13(1):5338.
- Xuan Wang, Yingqi Liu, Chencheng Xue, Yan Hu, Yuanyuan Zhao, Kaiyong Cai, Menghuan Li, Zhong Luo. A protein-based cGAS-STING nanoagonist enhances T cell-mediated anti-tumor immune responses. *Nat Commun.* 2022 Sep 28;13(1):5685.
- Jin-Fei Lin, Pei-Shan Hu, Yi-Yu Wang, Yue-Tao Tan, Kai Yu, Kun Liao, Qi-Nian Wu, Ting Li, Qi Meng, Jun-Zhong Lin, Ze-Xian Liu, Heng-Ying Pu, Huai-Qiang Ju, Rui-Hua Xu, Miao-Zhen Qiu. Phosphorylated NFS1 weakens oxaliplatin-based chemosensitivity of colorectal cancer by preventing PANoptosis. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Feb 28;7(1):54.
- Xiawei Dong, Jing Ye, Yihan Wang, Hongjie Xiong, Hui Jiang, Hongbing Lu, Xiaohui Liu, Xuemei Wang. Ultra-Small and Metabolizable Near-Infrared Au/Gd Nanoclusters for Targeted FL/MRI Imaging and Cancer Theranostics. *Biosensors (Basel).* 2022 Jul 24;12(8):558.
- Huifang Yin, Zhenglei Wang, Shoushen Yang, Xintian Zheng, Yinli Bao, Weiming Lin, Cuiqin Huang, Longxin Qiu. Taurine inhibits necroptosis helps to alleviate inflammatory and injury induced by Klebsiella infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2022 Aug;250:110444.
- Long-Long Zhang, Ya-Jun Liu, Yong-Hong Chen, Zhuang Wu, Bo-Ran Liu, Qian-Yi Cheng, Ke-Qin Zhang, Xue-Mei Niu. Modulating Activity Evaluation of Gut Microbiota with Versatile Toluquinol. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 14;23(18):10700.
- Xiaojin Li, Meng Qi, Kai He, Haiyan Liu, Wenlan Yan, Lizhuo Zhao, Yanyan Jia, Lei He, Chaochao Lv, Min Zhang, Zhiguo Wei, Wenchao Yan, Tianqi Wang, Fuchang Yu, Weifeng Qian. Neospora caninum inhibits tumor development by activating the immune response and destroying tumor cells in a B16F10 melanoma model. *Parasit Vectors.* 2022 Sep 23;15(1):332.
- Zhuqing Tian, Longbing Yang, Mingjiao Huang, Chaoqin Sun, Mingming Chen, Wenjing Zhao, Jian Peng, Guo Guo. Antitumor Activity and Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide AMP-17 on Human Leukemia K562 Cells. *Molecules.* 2022 Nov 21;27(22):8109.
- Weisin Chen, Miersalijiang Yasen, Hanquan Wang, Chenyang Zhuang, Zixiang Wang, Shunyi Lu, Libo Jiang, Hong Lin. Celecoxib activates autophagy

by inhibiting the mTOR signaling pathway and prevents apoptosis in nucleus pulposus cells. BMC Pharmacol Toxicol. 2022 Dec 1;23(1):90.

Version 2024.03.12