

# 凋亡与坏死实验报告

## 一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
青链霉素	合肥知恩生物	ZNCA-008
胰蛋白酶	合肥知恩生物	ZNCA-009
YO-PRO-1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒	碧云天	C1075S
胎牛血清	合肥知恩生物	ZNCA-007

## 二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
超净工作台	苏州安泰	SW-CJ-2FD
显微镜	江南永新	XD202
CO2 培养箱	Thermo	3111
荧光显微镜	广州明美	MF52

## 三、实验方法

### 背景介绍

YO-PRO-1, 又名恶唑黄(Oxazole yellow), 简称 YP1, 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。

### 检测步骤

- 接种培养。**将细胞以  $1 \times 10^5$  cells/孔铺在 24 孔板里培养, 过夜培养后按实验方案给药 48h 后进行检测。
- 洗涤。**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。
- 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。

- (4) **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)。