

Propidium iodide

1. 产品描述

Propidium iodide, 简称 PI, 中文名称碘化丙啶, 是一种常用的红色细胞核染色试剂。PI 作为溴化乙锭 (EB) 的类似物, 可嵌入双链 DNA 中, 这种结合没有序列偏爱性, 每 4-5 个 DNA 碱基对结合一个染料分子。当与 DNA 结合时, PI 的红色荧光增强 20 到 30 倍。PI 也能与 RNA 结合, 因此需要用核酸酶 (nucleases) 处理以区分 RNA 和 DNA 染色。

PI 进入细胞的能力取决于膜的渗透性。由于存在完整的质膜, PI 不会进入活细胞或早期凋亡细胞, 但却能穿过破损的细胞膜 (细胞处于坏死或晚期凋亡时)。

利用这一特性, 通常与 Calcein-AM、Hoechst 33258 或 Hoechst 33342 等活细胞荧光探针一起使用, 同时对活细胞和死细胞染色和鉴定, 用于细胞凋亡和坏死相关的研究。Annexin V / PI 联用是研究凋亡细胞的常用方法。PI 通常用于鉴定群体中的死细胞, 并在多色荧光技术中用作复染, 因为 PI 被认为只能穿透具有破裂膜的细胞, 并且通常被阻挡在活细胞之外。PI 的单独染色也可以进行细胞周期的检测。

PI 没有与 DNA 结合时, 最大激发和发射波长分别为 493 nm 和 636 nm。PI-DNA 复合物的最大激发和发射波长分别为 535 nm 和 615 nm。PI 可用于荧光显微镜、流式细胞仪以及荧光计检测。

2. 产品信息

货号	产品名称	规格
B7758	Propidium iodide	10mg

3. 使用方法

(1) 储存液配制

产品以粉末形式提供, 开盖前需要经过瞬时离心。如果产品是从冰箱中取出则需要先置于室温进行回温。称取 1 mg PI 粉末, 用 1 mL 去离子水充分溶解配成 1 mg/mL (1.5 mM) 的储存液。4°C 避光保存, 至少 6 个月稳定。储存液配置的浓度可以根据实验需求进行调整。

(2) 贴壁细胞复染步骤 (荧光显微镜检测)

1) 样本准备: 根据自身样本选择合适步骤固定细胞。PI 染色一般在其它染色完成后再进行。PI 复染要求细胞经透化处理。

2) RNase 酶处理: 若样本使用多聚甲醛, 甲醛或者戊二醛固定, 则需要进行 RNase 处理。若样本用甲醇/醋酸或者丙酮固定, 通常不需要此步操作。

a, 于 2×SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0) 溶液平衡样本;

b, 将本品置于含有 100 µg/mL DNase-free RNase 的 2×SSC 溶液中在 37°C 孵育 20 min;

c, 用 2×SSC 溶液清洗样本 3 次, 每次 1 min。

3) 复染:

- a, 于 $2\times$ SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0) 溶液平衡样本;
- b, 直接用 $2\times$ SSC 1:3000 稀释 1 mg/mL (1.5 mM) PI 储存液, 得到 500 nM 的 PI 工作液。通常添加 300 μ L 染液足够用于一个盖玻片细胞制片。染色 1-5 min。
- c, $2\times$ SSC 清洗几次, 流尽多余液体, 加入抗淬灭剂封片。
- d, 选择荧光显微镜的合适滤片进行观察。

(3) 悬浮细胞复染步骤 (流式细胞仪检测)

- 1) 样本准备: 根据自身样本选择合适的步骤固定细胞。或者使用如下的步骤:
 - a. 收集细胞, 密度约 $2\times 10^5\sim 1\times 10^6$ 。离心后吸掉上清, 留一些液体轻弹管壁重悬细胞。加入 1 mL 常温存放的 PBS;
 - b. 将所有的重悬细胞转移到 4 mL -20°C 预冷的无水乙醇中。在 -20°C 乙醇中固定 5-15 min。
 - c. 离心收集细胞, 除去乙醇。轻弹管壁以弹松细胞后, 加入 5 mL 室温的 PBS。允许细胞水化 15 min。
- 2) 复染
 - a. 用染色液 (100 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 0.1% Nonidet[®] P-40) 1:500 稀释 1 mg/mL (1.5 mM) PI 储存液, 得到 3 μ M 的 PI 工作液。1 mL 的 PI 染色液足够用于每个细胞样本的检测。【注】: 工作液浓度可以根据具体的实验进行调整, 也可以直接使用 PBS, HBSS 等缓冲液直接稀释 PI 储存液到需要的浓度。
 - b. 样本准备的最后一步后离心收集细胞, 去除上清, 用手轻弹管壁以弹松细胞后, 加入 1 mL 的 PI 染色工作液。室温孵育 15 min 后, 用流式细胞仪进行细胞分析。若用显微镜观察, 则需要离心样本, 去除上清并重悬细胞在新鲜的缓冲液中。吸取 1 滴悬液到载玻片上, 盖上盖玻片后观察。

(4) 染色质 FISH 复染步骤

- 1) 样本准备: 根据标准步骤制备样本。复染之前的最后一步用去离子水清洗样本以去除玻片上残留的缓冲液。室温晾干。此步骤有助于减少非特异性的背景染色。
- 2) 复染
 - a. 工作液的配制: 用 PBS 缓冲液直接 1:1000 稀释 1 mg/mL (1.5 mM) 的 PI 储存液, 得到 1.5 μ M 的 PI 染色工作液。直接滴加 300 μ L 的工作液到样本。有必要的話, 工作液内加入新鲜制备的 RNase A (终浓度: 10 μ g/mL)。可使用塑料盖玻片均匀分布染液在载玻片上。室温避光条件下孵育样本 30 min; 如果加入 RNase 则 37°C 孵育。
 - b. 去除盖玻片, 用 PBS 或去离子水清洗以除去没有结合的染料;
 - c. 用吸水纸围绕样本周围吸取残留液体, 盖上玻璃盖玻片用石蜡或指甲油封住盖玻片边缘。也可用抗荧光淬灭剂进行封片。
 - d. 选择荧光显微镜的合适滤片进行观察。

注意事项

- 1) 碘化丙啶 (PI) 是已知的诱变剂, 因此 PI 溶液在丢弃之前需要先经过活性炭处理。
- 2) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。本产品对人体有刺激性, 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。