

## AO/PI 双染色试剂盒使用说明书

### 【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-5807	AO/PI Staining Kit	100T/500T
	使用说明书	1 份

### 【试剂盒组成】

产品编号	产品名称	100T	500T
EK-5807A	AO 染色液	0.5ml	2.5ml
EK-5807B	PI 染色液	1ml	5ml
EK-5801C	10×染色缓冲液	10ml	50ml

### 【保存条件】

4℃避光保存有效期 6 个月，-20℃避光保存有效期 12 个月

### 【概述】

吖啶橙（Acridine Orange, AO）为一种荧光染料，该染料具有膜通透性，能透过细胞膜，使核 DNA 和 RNA 染色。其激发波长为 488nm，吸收波长为 515nm。它与细胞中 DNA 和 RNA 结合量存在差别，复合物可发出不同颜色的荧光，红色荧光为 AO-DNA(F>600nm)，绿色荧光为 AO-RNA 或单链 DNA(F>530nm)。在荧光显微镜下观察，吖啶橙可透过正常细胞膜，使细胞核呈绿色或黄绿色均匀荧光；而在凋亡细胞中，因染色质固缩或断裂为大小不等的片断，形成凋亡小体。吖啶橙使其染上致密浓染的黄绿色荧光，或黄绿色碎片颗粒；而坏死细胞黄荧光减弱甚至消失。

Propidium Iodide 是一种 DNA 结合性染料，其激发和发射波长分别为 488nm 和 630nm，产生红色荧光，但无膜通透性，不能透过活细胞膜，只能染死细胞。因此，在荧光显微镜下观察，正常细胞不能着色，早期凋亡细胞呈微弱红光，晚期凋亡细胞红光加强，坏死细胞呈强红色荧光。

### 【使用方法（仅供参考）】

#### 1. 染色缓冲液及工作液的配制：

① 根据样品数按下列比例配制染色缓冲液。取 100μL10×染色缓冲液加 900μL 无菌去离子水稀释，混匀即成 1×染色缓冲液。

① 每 500 $\mu$ L 染色缓冲液加入 5 $\mu$ L AO 染色液和 10 $\mu$ L PI 染色液，充分混匀，即成染色工作液。

注：不同细胞样本的染色浓度和时间有差异，可以根据预实验结果调整染色液浓度。以上条件适合大多数细胞样本。

## 2. 悬浮细胞染色

- ① 收集样本细胞，细胞数量在  $10 \times 10^5$  个以内。
- ② 用 PBS 洗涤细胞两次。
- ③ 用 500 $\mu$ L 染色工作液将细胞重悬。
- ④ 轻轻混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 10~20 分钟。
- ⑤ 用 PBS 洗涤细胞。
- ⑥ 用荧光显微镜或流式细胞仪检测结果。

## 3. 贴壁细胞原位染色

- ① 用 PBS 洗涤细胞两次。
- ② 注意洗细胞过程不要丢失细胞，需要离心收集漂浮细胞。
- ③ 细胞培养板中或细胞爬片上加入适量体积的染色工作液。
- ④ 37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 10~20 分钟，不同的细胞最佳培养时间不同。可以用 20 分钟作为起始孵育时间，之后优化体系以得到均一的标记结果。（若染色不够充分，建议增加染料浓度或延长染色时间。）

⑤ 吸干染色工作液，用培养基洗培养板或盖玻片 2~3 次，每次用预热的培养基覆盖所有细胞，然后吸干培养基。

## 4. 结果分析：

- ① 在荧光显微镜下，选用 488nm 激发光镜检：
- ② AO 染色正常细胞 DNA 呈均匀黄色或黄绿色，形态结构正常。
- ③ 当细胞凋亡时，染色质浓缩，细胞核碎裂成点状，被染成大小不一、致密浓染。坏死细胞呈强红色荧光。

### 【注意事项】

1. 仅用于实验室，不适合农业/家庭/临床用途使用。
2. 为了您的安全与健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。