



Hoechst33258/PI 细胞凋亡染色试剂盒

简介:

Hoechst33258/PI 细胞凋亡染色试剂盒(Hoechst 33258/PI Apoptosis Assay Kit)是一种采用 Hoechst 33258 和碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)双荧光染色方法进行细胞周期与细胞坏死分析的检测试剂盒;单纯的 PI 染色能够观察 DNA 直方图上凋亡细胞的亚 G1 峰,但只能代表 G0/G1 期发生凋亡,无法观察 S 期和 G2 期发生的细胞凋亡,而且细胞经过固定后无法对活细胞和死细胞进行区分。Hoechst33258 可以穿透细胞膜,进入正常细胞和凋亡细胞与 DNA 结合,能在紫外线下显示蓝色荧光,而且染色后凋亡细胞荧光会比正常细胞明显增强;PI 不能穿透细胞膜,对于具有完整细胞膜的正常细胞或凋亡细胞不能染色;而对于坏死细胞,其细胞膜的完整性丧失,PI 可以穿透细胞膜使坏死细胞着色产生红色荧光。

源叶生物 Hoechst33258/PI 双染后可在流式细胞仪上将正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞区别开来,在二元直方图上正常细胞对 Hoechst33258 具有拒染性,呈弱蓝色荧光+弱红色荧光(Hoechst33258+/PI+);凋亡细胞对 Hoechst33258 具有嗜染性,呈强蓝色荧光+弱红色荧光(Hoechst33258++/PI+);坏死细胞对 PI 具有嗜染性,呈弱蓝色荧光+强红色荧光;该试剂盒亦可用荧光显微镜进行观察,检测细胞含量范围一般为 $0.1 \sim 1 \times 10^6$ 之间。该试剂仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

组成:

名称 \ 编号	R30395 100T	Storage
试剂(A): Cell Stain Buffer(2×)	100ml	4℃
试剂(B): Hoechst33258 Stain	0.5ml	-20℃ 避光
试剂(C): PI Stain	0.5ml	-20℃ 避光
使用说明书	1 份	



自备材料:

- 1、胰蛋白酶消化液、PBS
- 2、流式细胞仪或荧光显微镜、细胞计数板

操作步骤(仅供参考):

1、细胞样品的制备:

(1)贴壁细胞:

- ①小心收集细胞培养液到一个无菌离心管内备用。
- ②用胰蛋白酶消化细胞至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时, 加入前面收集的细胞培养液, 吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞。
- ③收集上述细胞悬液到离心管内, 4℃ 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底, 小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50μl 培养液, 以免吸走细胞。
- ④加入约 1ml 提前预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移至 1.5ml 无菌离心管, 4℃ 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。
- ⑤小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50μl PBS, 以免吸走细胞, 轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。

(2)悬浮细胞:

- ①4℃ 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底, 小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50μl 培养液, 以免吸走细胞。
- ②加入约 1ml 提前预冷的 PBS, 重悬细胞, 并转移至 1.5ml 无菌离心管, 4℃ 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底。
- ③小心吸取上清并丢弃, 可留大约 50μl PBS, 以免吸走细胞, 轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。

2、配制 Cell Stain Buffer 工作液: 取适量 Cell Stain Buffer(2×)与无菌去离子水或蒸馏水等比例混合, 即为 Cell Stain Buffer 工作液, 4℃ 保存备用。

3、重悬细胞: 取上述收集好的 $0.1 \sim 1 \times 10^6$ 细胞, 加入 0.9ml Cell Stain Buffer 工作液, 重悬细胞沉淀。

4、Hoechst 33258/PI 染色:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

(1)一步法: 加入 5 μ l Hoechst 33258 Stain 和 5 μ l PI Stain, 轻轻混匀, 置于冰浴或 4 $^{\circ}$ C, 孵育 20~30min。

(2)两步法:

①加入 5 μ l Hoechst 33258 Stain, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴, 孵育 5~15min。

②置于冰水中冷却后, 4 $^{\circ}$ C 1000g 离心 3~5min, 使细胞沉到管底, 弃上层染色液。

③加入 0.9ml Cell Stain Buffer 工作液, 重悬细胞沉淀。

④加入 5 μ l PI Stain, 置于冰浴或 4 $^{\circ}$ C, 孵育 20~30min。

5、检测与分析: 用流式细胞仪在激发波长 400~500nm 检测蓝色荧光, 在大于 630nm 处检测红色荧光, 同时检测光散射情况; 采用适当分析软件进行细胞 DNA 含量分析和光散射分析; 如果使用荧光显微镜检测, 检测前 4 $^{\circ}$ C 1000g 离心 3~5min 沉淀细胞, 用 PBS 洗涤 1 次, 再涂片观察红色荧光和蓝色荧光。对于贴壁细胞使用荧光显微镜检测, 亦可不收集细胞, 弃培养液后直接依次按照上述比例加入试剂(A)、试剂(B)、试剂(C), 冰浴或 4 $^{\circ}$ C 染色 20~30min, 染色后 PBS 洗涤 1 次, 再在荧光显微镜下观察。

染色结果: 在蓝色荧光对红色荧光的散点图上, 正常细胞呈低蓝光/低红光, 凋亡细胞呈高蓝光/低红光, 坏死细胞呈低蓝光/高红光。

注意事项:

1、荧光染料都存在淬灭的问题, 建议染色后尽快检测。

2、在为了获得细胞沉淀的离心的过程中, 对于特殊细胞, 如果细胞沉淀不充分, 可以适当提高离心力或延长离心时间。

3、Hoechst 33258 与细胞孵育的时间不宜过长, 一般控制在 20min 以内, 太长容易引起 Hoechst 33258 的发射光谱由蓝光向红光迁移, 导致红色荧光与蓝色荧光的比例改变。

4、如果用于组织的细胞周期与细胞凋亡检测, 则必须把组织消化后, 制备成单细胞悬液, 才可以进行检测



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

5、PI 对人体有一定刺激性，请注意适当防护。

6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期： 12 个月有效；2~8℃运输，按产品要求分开保存。

