

Hoechst 33342/PI Double Stain Kit

Hoechst 33342/PI 双染试剂盒

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hoechst 33342/PI Double Stain Kit Hoechst 33342/PI 双染试剂盒	40744ES60	100 T

产品描述

Hoechst 33342/PI 双染试剂盒 (Hoechst 33342/PI Double Stain Kit) 采用 Hoechst 33342 和碘化丙啶 (PI) 双染的方法以区分凋亡细胞和坏死细胞的试剂盒。其检测原理是：细胞核荧光染料 Hoechst 33342 可以穿透细胞膜，嵌入双链 DNA 后释放蓝色荧光。对于正常细胞，其可少许进入细胞膜使其染上低蓝色。而凋亡细胞由于细胞膜通透性增强，从而使得进入凋亡细胞内的 Hoechst 33342 明显多于正常细胞，荧光强度比正常细胞要高。另外，细胞发生凋亡时染色质会固缩，从而使得染料能更有效和聚集的结合于 DNA，并且凋亡细胞膜上的 p-糖蛋白泵功能受损而不能有效的将 Hoechst 33342 排除到细胞外使其在细胞内的积累增加，这些特征都使得凋亡细胞经染色后荧光会比正常细胞明显增强。但细胞核荧光染料 PI 不能穿透细胞膜完整的正常细胞或凋亡细胞，即活细胞对 PI 染料拒染。而对于坏死细胞，其细胞膜的完整性在早期即已丧失，可被 PI 染色。

经上述两种染料双染后，使用流式细胞仪或荧光显微镜检测时，正常细胞为弱红色荧光+弱蓝色荧光，凋亡细胞为弱红色荧光+强蓝色荧光，坏死细胞为强红色荧光+弱蓝色荧光。

本试剂盒染色快速方便，可用一步法或者两步法进行染色。使用流式细胞仪检测时，无需稀释等配制过程，也无需再准备其它任何溶液。本试剂盒足够检测 100 个样品，每个样品的细胞数量可达 10^5 - 10^6 个。

产品组分

组分编号	组分名称	40744ES60 (100T)	保存方法
40744-A	Hoechst 33342 染色液 Hoechst 33342 Stain Solution	500 μ L	4℃或-20℃避光保存
40744-B	PI 染色液 PI Stain Solution	500 μ L	4℃或-20℃避光保存
40744-C	细胞染色缓冲液 Cell Stain Buffer	100 mL	4℃或-20℃保存

运输与保存方法

冰袋运输。4℃保存，有效期 12 个月。-20℃保存，有效期 24 个月，建议分装避免反复冻融。

注意事项

- 1) Hoechst 33342、PI 对人体有害，请注意适当防护；
- 2) Hoechst 33342、PI 需避光，整个实验过程尽量避光操作；
- 3) 荧光染料均存在淬灭情况，建议染色后需尽快检测；
- 4) Hoechst 33342 与细胞孵育时间不宜过长，一般控制在 20 min 以内。太长容易引起该染料的发射光谱由蓝光向红光迁移，导致红色荧光和蓝色荧光比例改变。
- 5) 如果用于组织样品检测，则必须把组织消化制备成单细胞悬浮液后才可以进行检测。
- 6) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 7) 本产品仅作科研用途！

操作步骤

1. 样品准备贴壁细胞: 小心吸除培养液至一个无菌离心管内备用。胰酶消化细胞, 加入上述培养液, 吹打所有贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞, 收集至离心管内, 4℃, 1000 g 离心 3-5 min, 使细胞沉淀至管底。小心吸除上清, 可留约 50 μL 培养液, 以免吸到细胞。加入约 1 mL 预冷 PBS (Yeasen, 货号: 60145ES76), 重悬细胞, 并转移至 1.5 mL 无菌离心管。4℃, 1000 g 离心 3-5 min, 使细胞沉淀至管底。小心吸除上清, 可留约 50 μL PBS, 以免吸到细胞。轻弹离心管底适当分散细胞, 避免细胞成团。

悬浮细胞: 4℃, 1000 g 离心 3-5 min, 使细胞沉淀至管底。小心吸除上清, 可留约 50 μL 培养液, 尽量避免吸到细胞。加入约 1 mL 预冷 PBS, 重悬细胞, 并转移至 1.5 mL 无菌离心管。4℃, 1000 g 离心 3-5 min, 使细胞沉淀到管底。小心吸除上清, 可留约 50 μL PBS, 以免吸到细胞。轻弹离心管底适当分散细胞, 避免细胞成团。

2. 重悬细胞: 取上述收集好的 10^5 - 10^6 个细胞, 加入 0.8-1 mL 细胞染色缓冲液重悬细胞。

3. 细胞染色:

3.1 一步法染色

- 1) 加入 5 μL Hoechst 33342 染色液。
- 2) 加入 5 μL PI 染色液。
- 3) 轻轻混匀, 冰浴或 4℃ 孵育 20-30 min。【注: 尽快进行后续荧光检测】

3.2 两步法染色:

- 1) 加入 5 μL Hoechst 33342 染色液, 置于 37℃ 孵育 5-15 min;
- 2) 置于冰水浴中冷却后, 4℃ 1000 g 离心 3-5 min, 吸除上层染色液;
- 3) 加入 0.8-1 mL 细胞染色缓冲液重悬细胞沉淀;
- 4) 加入 5 μL PI 染色液, 置于冰浴或 4℃, 孵育 5-15 min。【注: 尽快进行后续荧光检测】

4. 检测与分析

4.1 流式细胞仪检测: Hoechst 33342 用氩离子激光激发紫外光, 与 DNA 结合后其最大激发波长为 352 nm, 发射波长为 400-500 nm (最大激发波长 461 nm), 产生蓝色荧光; PI 用氩离子激光激发荧光, 与 DNA 结合后可用激发波长 488 nm (最大激发波长 535 nm), 发射波长大于 575 nm (最大激发波长 617 nm), 产生红色荧光, 分析蓝色荧光对红色荧光的散点图或地形图。

结果判断: 在蓝色荧光对红色荧光的散点图上, 可将细胞分为三个群:

正常细胞: 弱蓝色荧光+弱红色荧光【Hoechst 33342⁺/PI⁺】;

凋亡细胞: 强蓝色荧光+弱红色荧光【Hoechst 33342⁺⁺/PI⁺】;

坏死细胞: 弱蓝色荧光+强红色荧光【Hoechst 33342⁺/PI⁺⁺】。

4.2 荧光显微镜观察: 检测前 4℃ 1000 g 离心 3-5 min, 沉淀细胞, 用 PBS 洗涤一次, 再涂片观察红色和蓝色荧光。

【注】: 对于贴壁细胞使用荧光显微镜检测, 可以不收集细胞, 弃培养液, 之后用 PBS 洗涤细胞一次, 弃 PBS 洗涤液。然后直接依次按照上述比例加入细胞染色缓冲液、Hoechst 33342 染色液和 PI 染色液冰浴或 4℃ 染色 20-30 min。染色后 PBS 洗涤一次, 然后在荧光显微镜下观察。Hoechst 33342 用氩离子激光激发紫外光, 与 DNA 结合后其最大激发波长为 352 nm, 发射波长为 400-500 nm (最大激发波长 461 nm), 产生蓝色荧光; PI 用氩离子激光激发荧光, 与 DNA 结合后可用激发波长 488 nm (最大激发波长 535 nm), 发射波长大于 575 nm (最大激发波长 617 nm), 产生红色荧光。