

Hoechst 33258/PI 细胞凋亡染色试剂盒

Hoechst 33258/PI apoptotic Staining Kit

货号： S0006

规格： 100T

保存条件：

-20℃避光保存，有效期 6 个月。避免反复冻融。

简介：

Hoechst 33258/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。

Hoechst 33258 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。

Hoechst 33258/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 Hoechst 33258 具有拒染性，呈弱蓝色荧光 + 弱红色荧光 (Hoechst 33258+/PI+); 凋亡细胞对 Hoechst 33258 具有嗜染性呈强蓝色荧光+弱红色荧光 (Hoechst 33258++/PI+); 坏死细胞对 PI 具有嗜染性，呈弱蓝色荧光 + 强红色荧光 (Hoechst 33258+/PI++)。本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 ~ 1×10⁶ 之间。

本产品仅用于科研，不宜用于临床诊断或其他用途。

组成：

名称	规格	100T	Storage
S0006 (A): Cell Stain Buffer(2×)		100ml	4℃
无菌去离子水或蒸馏水等比例混合，即为 Cell Stain Buffer 工作液。			
S0006 (B): Hoechst 33258 Stain		0.5ml	-20℃ 避光
S0006 (C): PI Stain		0.5ml	-20℃ 避光

自备材料：

流式细胞仪或荧光显微镜、PBS、细胞计数板。

使用说明：

1. 细胞样品的制备：

(1) 贴壁细胞：

- a. 小心收集细胞培养液到一个无菌离心管内备用。
- b. 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。
- c. 收集上述细胞悬液到离心管内。
- d. 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 50ul 培养液，以免吸走细胞。
- e. 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。
- f. 4℃，1000g 离心 3~5min，使细胞沉到管底。
- g. 小心吸取上清并丢弃，可留大约 50ul PBS，以免吸走细胞。
- h. 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：

- a. 4℃，1000g 离心 3~5min，使细胞沉到管底。
- b. 小心吸取上清并丢弃，可留大约 50ul 培养液，以免吸走细胞。
- c. 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。
- d. 4℃，1000g 离心 3~5min，使细胞沉到管底。
- e. 小心吸取上清并丢弃，可留大约 50ul PBS，以免吸走细胞。
- f. 轻轻弹击离心管底以适当分散细胞，避免细胞成团。

2. 重悬细胞：

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

3. Hoechst 33258/PI 染色：

(1) 一步法：分别加入 5ul Hoechst 33258 Stain 和 5ul PI Stain，轻轻混匀，置于冰浴或 4℃，孵育 20~30min。

(2) 两步法：

- a. 加入 5ul Hoechst 33258 Stain，置于 37℃水浴，孵育 5~15min
- b. 置于冰水中冷却后，4℃ 1000g 离心 3~5min，使细胞沉到管底，弃上层染色液。
- c. 加入 0.9ml Cell Stain Buffer 工作液，重悬细胞沉淀。
- d. 加入 5ul PI Stain，置于冰浴或 4℃，孵育 5~15min。
- e. 轻轻混匀，置于冰浴或 4℃，孵育 20~30min。

4. 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℃ 1000g 离心 3~5min 沉淀细胞，用 PBS 洗涤一次，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盒试剂(A)、(B)、(C)，冰浴或 4℃染色 20~30 分钟。染色后 PBS 洗涤一次，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，建议染色后尽量当天完成检测。活细胞或组织染色后宜立即观察。为减缓荧光淬灭可以使用抗荧光淬灭封片液(C02-04003)。
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. Hechst 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 Hechst 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
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。