

## Hoechst33258/PI 细胞凋亡染色试剂盒

### 产品简介:

Leagene Hoechst33258/PI 细胞凋亡染色试剂盒 (Hoechst 33258/PI Apoptosis Assay Kit) 是一种采用 Hoechst 33258 和碘化丙啉 (Propidium Iodide, PI) 双荧光染色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; 对于具有完整细胞膜的正常细胞或凋亡, PI 不能穿透细胞膜, 因此不能使细胞染色; 而对于细胞膜完整性丧失的坏死细胞, PI 可以穿透细胞膜使其着色, 产生红色荧光。

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。

### 产品组成:

名称	编号	DA0019	Storage
		100T	
试剂(A): Cell Stain Buffer(2×)		100ml	4°C
试剂(B): Hoechst33258 Stain		0.5ml	-20°C 避光
试剂(C): PI Stain		0.5ml	-20°C 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°C 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°C 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°C 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°C 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°C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:

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

(2)两步法:

- ①加入 5µl Hoechst 33258 Stain,置于 37°C水浴,孵育 5~15min。
- ②置于冰水中冷却后,4°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 5µl PI Stain,置于冰浴或 4°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°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°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、Heochst 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 Heochst 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。

**有效期：**12 个月有效；低温运输，按要求保存。

**相关产品：**

产品编号	产品名称
CC0130	胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.25%:0.02%)
DA0001	DAPI 染色液(5µg/ml)
DA0065	台盼蓝染色液(0.4%)
DC0032	Masson 三色染色液
DZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
PE0103	Acr-Bis(30%,29:1)
TC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)
TC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)