

## Hoechst 33342/PI Double Stain Kit 凋亡/坏死双染试剂盒

产品编号	产品名称	包装规格
NBS8036-100T	Hoechst 33342/PI Double Stain Kit 凋亡/坏死双染试剂盒	100T

### 产品简介:

Hoechst 33342/PI 细胞凋亡双染试剂盒 (Hoechst 33342/PI Double Stain Kit) 是一种采用 Hoechst 33342 和碘化丙啉 (Propidium Iodide, PI) 双染进行细胞凋亡与坏死分析的检测试剂盒。检测原理在于: Hoechst 33342 是一种活细胞核染料, 能穿透正常细胞以及凋亡细胞膜, 与 DNA 结合 (最大激发波长为 350nm, 发射波长为 461nm), 呈现蓝色荧光。当细胞发生凋亡, 染色质发生固缩, 染色后的细胞荧光比正常细胞明显增强。而 PI 是一种死细胞核染料, 不能穿透细胞膜, 对于具完整细胞膜的正常细胞或凋亡细胞不能染色。但对于坏死细胞, 由于膜的完整性丧失, PI 能够穿透进入细胞, 与 DNA 结合 (最大激发波长为 536nm, 发射波长为 617nm), 呈现红色荧光。经 Hoechst 33342/PI 双染后, 使用流式细胞仪或荧光显微镜检测, 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。

本试剂盒可检测 100 个样品, 每个样本的细胞数量可为  $10^5$ - $10^6$  个。

### 保存条件:

-20℃保存, 1 年有效。使用频繁可置 4℃保存, 5 个月有效。

Hoechst 染色液和 PI 染色液需避光保存。

**产品组成：**

组分	名称	规格	保存
NBS8036-A	Cell Stain Buffer 细胞染色缓冲液 (2×)	100ml	4°C或-20°C
NBS8036-B	Hoechst 33342 StainHoechst 染色液	0.5ml	-20°C避光
NBS8036-C	PI Stain PI 染色液	0.5ml	-20°C避光

**一、细胞样本制备****1.1 贴壁细胞**

1.1.1 小心收集细胞培养液到一个无菌离心管内备用；

1.1.2 用胰蛋白酶消化细胞至细胞可以轻轻用移液枪或枪头吹打下来，加入前面收集的细胞培养液，吹打下所有贴壁细胞，并轻轻吹散细胞

1.1.3 收集上述细胞悬液到离心管内，4°C，1000g 离心 3~5min，使细胞沉至管底，小心吸取上清并丢弃，可留约 50μl 培养液，以免吸走细胞。【注意】：某些特殊细胞，如果沉淀不充分，可以适当提高离心力或者延长离心时间。

1.1.4 加入约 1ml 提前预冷的 PBS，重悬细胞，并转移到 1.5ml 无菌离心管，4°C，1000g 离心 3~5min，使细胞沉至管底。

1.1.5 小心吸取上清并丢弃，可留约 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。

**1.2 悬浮细胞**

1.2.1 4°C，1000g 离心 3~5min，使细胞沉至管底，小心吸取上清并丢弃，可留约 50μl 培养液，以免吸走细胞。

1.2.2 加入约 1ml 提前预冷的 PBS，重悬细胞，并转移到 1.5ml 无菌离心管，4°C，1000g 离心 3~5min，使细胞沉至管底。

1.2.3 小心吸取上清并丢弃，可留约 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。

## 二、染色前制备

2.1 细胞染色缓冲液 (1×) 的准备：取适量细胞染色缓冲液 (2×) 与无菌去离子水或蒸馏水等比例混合，即为细胞染色缓冲液 (1×)，4℃保存备用。

2.2 细胞重悬：将上述收集好的  $0.1 \sim 1 \times 10^6$  细胞，加入 0.9ml 细胞染色缓冲液 (1×)，重悬细胞沉淀。

## 三、Hoechst 33342/PI 双染

3.1 加入 5μl Hoechst 33342 染色液，置于 37℃水浴，孵育 5~15min。

3.2 置于冰水冷却，4℃，1000g 离心 3~5min，使细胞沉至管底，弃上层染色液。

3.3 加入 0.9ml 细胞染色缓冲液 (1×)，重悬细胞沉淀。

3.4 加入 5μl PI 染色液，置于冰浴或 4℃，孵育 20~30min。

**【注意】**：也可一步法进行染色：加入 5μl Hoechst 33342 染色液和 5μl PI 染色液，轻轻混匀，置于冰浴或 4℃，孵育 20~30min。

## 四、结果分析

### 4.1 流式细胞仪检测

用流式细胞仪在激发波长 400~500nm 处检测蓝色荧光，在  $> 630\text{nm}$  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。

### 4.2 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，再涂片观察红色和蓝色荧光。

**【注意】**：对于贴壁细胞，也可不收集细胞，弃培养液后直接依次按照上述比例加入细胞染色

缓冲液 (1×)、Hoechst 33342 染色液、PI 染色液, 置于冰浴或 4°C, 孵育 20 ~ 30min。染色后, PBS 洗涤一次, 再在荧光显微镜下观察。

### 4.3 结果呈现

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. 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。

本产品仅用于生命科学研究, 不得用于医学诊断及其他用途!