

Hoechst 33342/PI 细胞凋亡双染试剂盒 使用说明书

货号：SK2040

规格：100T

保存条件：-20 度保存，有效期 1 年。

产品内容：

产品内容	SK2040
细胞染色缓冲液	125mL
Hoechst 33342 染色液	0.5mL
PI 染色液	0.5mL
说明书	1 份

产品简介：

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。

操作步骤：

一步法染色

1. 每个样品收集约 10-100 万细胞于 1.5 mL 离心管内，离心弃上清。细胞沉淀用 0.8~1 mL 细胞染色缓冲液重悬。
2. 加入 5 μ L Hoechst 33342 染色液。
3. 加入 15 μ L PI 染色液。
4. 混匀，冰浴或 4 $^{\circ}$ C 孵育 20~30 min。
5. 观察与分析。

两步法染色

1. 每个样品收集约 10-100 万细胞于 1.5 mL 离心管内，离心弃上清。细胞沉淀用 0.8~1 mL 细胞染色缓冲液重悬。
2. 加入 5 μ L Hoechst 33342 染色液，置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 5~15 min。
3. 置于冰水浴中冷却后，4 $^{\circ}$ C 1000g 离心 3~5 min，吸除上层染色液。
4. 加入 0.8~1 mL 细胞染色缓冲液重悬细胞沉淀。
5. 加入 15 μ L PI 染色液，置于冰浴或 4 $^{\circ}$ C，孵育 5~15 min。
6. 观察与分析。

注意：对于贴壁细胞可以胰酶消化，PBS 洗涤后收集细胞沉淀后再进行染色。

染色结果观察

1. 荧光显微镜观察：

如果使用荧光显微镜检测，检测前离心沉淀细胞，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，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 $^{\circ}$ C 染色 20-30 min。染色后 PBS 洗涤一次，然后在荧光显微镜下观察。

2. 流式细胞仪分析：

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。流式细胞仪的散点图上，可分为三群细胞，分别表现为：正常细胞为低蓝色/低红色（Hoechst33342+/PI+），凋亡细胞为高蓝色/低红色（Hoechst33342++/PI+），坏死细胞为低蓝色/高红色（Hoechst33342+/PI++）。