

Hoechst 33342/PI 双染试剂盒产品说明书

产品编号:

FY600007-100T

存储条件:

2-8 °C避光保存, 有效期6个月;
-20 °C避光保存, 有效期12个月;
避免反复冻融。

产品组分

编号	名称	100T
A	Hoechst 33342	500 μ l
B	Propidium Iodide	500 μ l

产品简介:

本产品基于Hoechst 33342和碘化丙啉 (PI) 双染的方法以区分活细胞和死细胞。细胞核荧光染料Hoechst 33342可以穿透细胞膜, 嵌入双链 DNA, 可激发出蓝色荧光。对于活细胞和死细胞, Hoechst 33342均能进入细胞内使DNA所在部位在紫外激发下呈蓝色。PI也是一种双链DNA染料, 嵌入双链DNA中可以激发出红色荧光。但PI不能穿透细胞膜完整的正常细胞或凋亡细胞早期细胞, 即活细胞不能被PI染色。而对于死细胞, 其细胞膜的完整性已丧失, 可被 PI 染色。

综上所述, 经上述两种染料双染后, 使用荧光显微镜检测时, 活细胞仅可激发出蓝色荧光, 死细胞则可激发出红色荧光+蓝色荧光。

本试剂盒染色快速方便使用荧光显微镜检测时, 无需稀释等配制过程, 也无需再准备其他任何溶液。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。

本产品可用于培养的贴壁细胞或者悬浮细胞检测。

自备耗材和设备:

1 ml 移液器;
100-200 μ l 移液器;
荧光显微镜;
PBS。

适用实验与操作过程:

1. 细胞准备

贴壁细胞: 弃细胞培养液, 加入0.5 ml细胞培养液或PBS。

悬浮细胞: 收集细胞悬液, 1000 g离心5分钟, 弃上清。

沉淀用0.5 ml的0.5 ml细胞培养液或PBS。

2. 染色

Hoechst 33342/PI染色工作液配置: 0.5 ml PBS中加入5 μ l Hoechst33342染液 (A液) 和5 μ l PI染液 (B液), 混匀待用。

贴壁细胞: 每个细胞样品加入0.5 ml配置好的Hoechst33342/PI染色工作液。冰浴或 4°C, 避光孵育20-30分钟。

悬浮细胞: 每个细胞样品加入0.5 ml配置好的Hoechst33342/PI染色工作液。冰浴或 4°C, 避光孵育20-30分钟。

注意: 染色结束后尽快进行后续荧光检测, 每个检测细胞数不超过 1×10^6 个。

3. 检测与分析

荧光显微镜观察:

贴壁细胞: 检测前弃去染色液, PBS洗涤一次, 加入PBS保持细胞活性, 然后在荧光显微镜下观察。

悬浮细胞: 4°C 1000 g离心 3-5分钟, 沉淀细胞, 用 PBS洗涤一次。用PBS重新悬浮细胞, 置于培养板中观察红色和蓝色荧光

Hoechst 33342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), 即在紫外光激发下产生蓝色荧光; PI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), 即在黄色激光激发下产生红色荧光。



注意事项与常见问题:

1. 是否需要防护?

Hoechst 33342、PI具有毒性，操作时应注意防护，保护眼睛、避免吸入、并戴一次性手套。

2. 是否需要避光?

Hoechst 33342、PI存在淬灭现象，保存和使用过程中注意避光，建议染色后需尽快检测。

3. 单个反应的细胞数量是否有要求?

推荐细胞数量 10^5 - 10^6 个之间。原则上只要求染色液的量与细胞量匹配，即细胞量多时可根据具体情况按比例增加染色液的量，细胞量少时按比例减少染色液的量。一般染色液过量短时间内不影响染色效果，但染色液不足时会导致检测数据不准确。

4. 细胞染色时间有何要求?

Hoechst 33342与细胞孵育时间不宜过长，一般控制在

20分钟以内。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。时间过长也会导致细胞状态与真实状态不一致，可能导致检测数据不准确。

5. 能否用于流式检测?

可以尝试进行流式检测。贴壁细胞不建议用于流式检测，因为贴壁细胞脱壁处理会影响细胞状态或者破坏细胞膜，导致PI染色细胞数量偏多，从而偏离真实。悬浮细胞可以进行流式检测，操作尽量在短时间内完成。

6. 能否检测凋亡细胞?

原则上该试剂盒只能检测细胞膜通透性的差异，即非通透性的细胞膜只允许Hoechst 33342进入，通透性的细胞膜同时也允许PI进入。Hoechst 33342在活性较好的细胞中也可被细胞主动排出细胞外，所以亮度相对低，但仅是相对关系，难以绝对说明问题。所以不建议用Hoechst 33342的染色亮度分辨细胞凋亡。

相关产品

名称	货号
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (FITC)	FY600017
Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒	FY600003
Annexin V-GFP/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒	FY600016
CCK-8 试剂盒	FY600001
PI 细胞周期与凋亡试剂盒	FY600002

