

# M5 HiPer Hoechst 33342 PI 双染试剂盒

## 使用说明书

| 产品名称                            | 单位   | 货号       |
|---------------------------------|------|----------|
| M5 HiPer Hoechst 33342 PI 双染试剂盒 | 100T | MF941-01 |
| M5 HiPer Hoechst 33342 PI 双染试剂盒 | 500T | MF941-05 |

**【储存条件】** 4℃避光干燥，12个月

### 【产品简介】

Hoechst 33342/PI 双染试剂盒采用 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：荧光染料 Hoechst 33342 能少许进入正常细胞膜，使其染上低蓝色，而凋亡细胞的膜通透性增强，因此进入凋亡细胞中的 Hoechst 33342 比正常细胞的多，荧光强度要比正常细胞中要高，此外，凋亡细胞的染色体 DNA 的结构发生了改变从而使该染料能更有效地与 DNA 结合，并且凋亡细胞膜上的 p-糖蛋白泵功能受到损伤不能有效地将 Hoechst 33342 排出到细胞外使之在细胞内积累增加等都使凋亡细胞的蓝色荧光增强。PI 染料是不能进入细胞膜完整的正常细胞和凋亡细胞中，即活细胞对 PI 染料拒染，而坏死细胞由于膜完整性在早期即已破损，可被 PI 染料染色。

根据这些特性，经上述两种染料双染后使用流式细胞仪或荧光显微镜检测时将正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞区别开来。在双变量流式细胞仪的散点图上，这三群细胞表现分别为：正常细胞为低蓝色/低红色 (Hoechst 33342+/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 (Hoechst 33342+/PI++)。

本试剂盒染色快速方便，两种染料的染色仅需 20-30 分钟，一步染色即可完成。可用一步法或者两步法进行染色。使用流式细胞仪检测时，无需稀释等配制过程，也无需再准备其它任何溶液。本试剂盒足够检测 100 个样品，每个样品的细胞数量可达 105-106 个。

### 【产品组分】

|                   |       |
|-------------------|-------|
| 细胞染色缓冲液 (PBS)     | 100ml |
| Hoechst 33342 染色液 | 0.5ml |
| PI 染色液            | 0.5ml |

### 【操作说明】

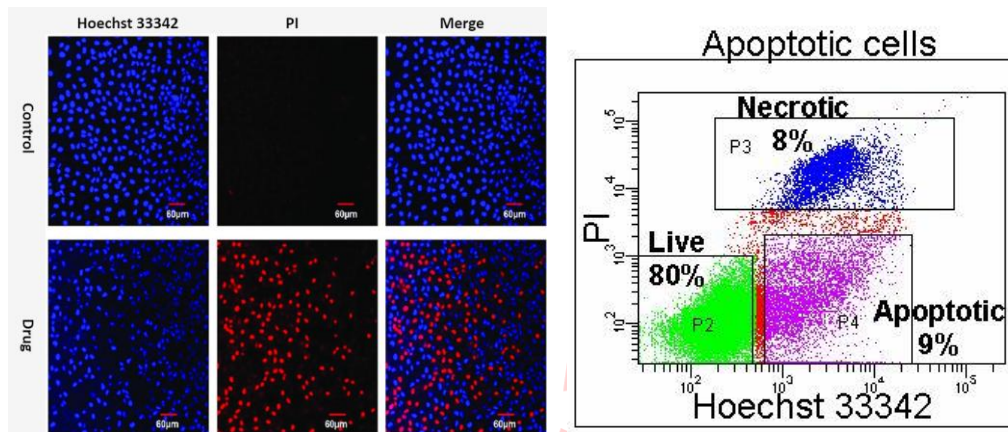
1. 悬浮生长的细胞离心收集，固定培养的细胞消化收集后，将  $10^5 \sim 10^6$  个细胞悬浮于 1ml 培养基中，离心弃上清。细胞沉淀用 0.8-1 毫升细胞染色缓冲液重悬浮细胞。
2. 加入 5ul Hoechst 染色液。
3. 加入 5ul PI 染色液。
4. 混匀，冰浴或 4℃ 孵育 20-30 分钟。
5. 用流式细胞仪检测红色荧光和蓝色荧光。
6. 如果使用荧光显微镜检测，检测前离心沉淀细胞，用 PBS 洗涤一次，再涂片观察红色荧光和蓝色荧光。

对于贴壁细胞使用荧光显微镜检测，可以不收集细胞，直接依次按照上述比例加入细胞染色缓冲液、Hoechst 染色液和 PI 染色液冰浴或 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。流式细胞仪分析或荧光显微镜观察：Hoechst 33342 用氩激光激发的紫外光，激发波长为 352nm，发射波长为 400 ~ 500nm，产生蓝色荧光；PI 用氩离子激光激发荧光，激发光波波长为 488nm，发射光波波长大于 630nm，产生红色荧光。分析蓝色荧光对红色荧光的散点图或地形图。

**结果判断：**在蓝色荧光对红色荧光的散点图上，结果为：正常细胞为低蓝光/低红光，凋亡细胞为高蓝光/低红光，坏死细胞为低蓝光/高红光。

**【注意事项】**

- 1) 在红色荧光对蓝色荧光散点图上，还可见到细胞凋亡区向细胞坏死区迁移的轨迹，可能是凋亡细胞的 DNA 进一步降解的缘故。
- 2) 用 Hoechst 33342 染料与细胞孵育的时间不宜过长，一般控制在 20min 之内为宜。如果太长可引起 Hoechst33342 的发射光谱由蓝光向红光的迁移，导致红色荧光与蓝色荧光的比例改变，从而影响结果的判断。
- 3) 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。
- 4) 为减缓荧光淬灭可以使用抗荧光淬灭封片液。
- 5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套和口罩操作。

**【参考图片】****【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。