

Hoechst33258/PI细胞凋亡染色试剂盒

产品货号: R23269

产品规格: 100T

产品简介:

Hoechst33258/PI细胞凋亡染色试剂盒(Hoechst 33258/PI Apoptosis Assay Kit)是一种采用Hoechst 33258和碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)双荧光染色方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。PI不能穿透细胞膜,对于具有完整细胞膜的正常细胞或凋亡细胞不能染色。而对于坏死细胞,其细胞膜的完整性丧失,PI可以穿透细胞膜使坏死细胞着色产生红色荧光。

Hoechst 33258/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(Hoechst 33258+/PI+);凋亡细胞对Hoechst33258具有嗜染性,呈强蓝色荧光+弱红色荧光(Hoechst 33258++/PI+);坏死细胞对PI具有嗜染性,呈弱蓝色荧光+强红色荧光。本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。

产品组成:

| 产品名称 | 100T | 保存条件 |
|------------------------------|-------|----------|
| 试剂(A): Cell Stain Buffer(2×) | 100ml | 4℃ |
| 试剂(B): Hoechst 33258 Stain | 0.5ml | -20℃, 避光 |
| 试剂(C): PI Stain | 0.5ml | -20℃, 避光 |

自备材料:

1. 胰蛋白酶消化液
2. 流式细胞仪或荧光显微镜
3. PBS
4. 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℃1000g离心3~5 min,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℃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℃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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

- 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℃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℃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℃，孵育20~30min。
 - (2)两步法：
 - ①加入5μl Hoechst 33258 Stain，置于37℃水浴，孵育5~15 min
 - ②置于冰水中冷却后，4℃ 1000g离心3~5 min，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℃，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℃ 1000g离心3~5min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，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℃染色20~30min。染色后PBS洗涤一次，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. Hoechst 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Hoechst 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。4℃保存，5~6个月有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com