Hoechst33258/PI 细胞凋亡染色试剂盒

产品简介:

Hoechst33258/PI 细胞凋亡染色试剂盒(Hoechst 33258/PI Apoptotis Assay Kit)是一种采用 Hoechst 33258 和碘化丙啶(Propidium Iodide，PI)双荧光染色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；对于具有完整细胞膜的正常细胞或凋亡，PI 不能穿透细胞膜，因此不能使细胞染色；而对于细胞膜完整性丧失的坏死细胞，PI 可以穿透细胞膜使其着色，产生红色荧光。

Hoechst33258/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(Hoechst33258+/PI+)；凋亡细胞对 Hoechst33258 具有嗜染性，呈强蓝色荧光+弱红色荧光(Hoechst33258++/PI+)；坏死细胞对 PI 具有嗜染性，呈弱蓝色荧光＋强红色荧光；该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 0.1～1×10^6之间。该试剂仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称 \ 编号	GCDA0019 100T	Storage
试剂(A): Cell Stain Buffer(2×)	100ml	4℃
试剂(B): Hoechst33258 Stain	0.5ml	-20℃ 避光
试剂(C): PI Stain	0.5ml	-20℃ 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、胰蛋白酶消化液、PBS

2、流式细胞仪或荧光显微镜、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 3～5min，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。

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。

⑵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。

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 0.1～1×10^6 细胞，加入 0.9ml Cell Stain Buffer 工作液，重悬细胞沉淀。

4、Hoechst 33258/PI 染色：

⑴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。

⑵两步法：

①加入 5μl Hoechst 33258 Stain，置于 37℃水浴，孵育 5～15min。

②置于冰水中冷却后，4℃ 1000g 离心 3～5min，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 1 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 1 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、Heochst 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 Heochst 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；低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCCC0130	胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.25%:0.02%)
GCDA0001	DAPI 染色液(5μg/ml)
GCDA0065	台盼蓝染色液(0.4%)
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
GCPE0103	Acr-Bis(30%,29:1)
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)
GCTC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)