

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:



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- 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0.1~1×10⁶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

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>