

# Hoechst33342/PI 细胞凋亡染色试剂盒说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

## 产品简介：

Hoechst33342/PI 细胞凋亡染色试剂盒(Hoechst 33342/PI Apoptosis Assay Kit)是一种采用 Hoechst 33342 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 33342 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 33342/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 Hoechst33342 具有拒染性，呈弱蓝色荧光+弱红色荧光(Hoechst 33342+/PI+)；凋亡细胞对 Hoechst33342 具有嗜染性，呈强蓝色荧光+弱红色荧光(Hoechst 33342++/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 0.1~1×10<sup>6</sup> 之间。

## 自备材料：

胰蛋白酶消化液

流式细胞仪或荧光显微镜

PBS

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 50  $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C 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 50  $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C 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 50  $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C 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 50  $\mu$ l 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 $\times$ )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 $^{\circ}$ C 保存备用。

3、重悬细胞：取上述收集好的 0.1~1 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞，加入 0.9ml Cell Stain Buffer 工作液，重悬细胞沉淀。

4、Hoechst 33342/PI 染色：

(1)一步法：加入 5  $\mu$ l Hoechst 33342 Stain 和 5  $\mu$ l PI Stain，轻轻混匀，置于冰浴或 4 $^{\circ}$ C，孵育 20~30min。

(2)两步法：

①加入 5  $\mu$ l Hoechst 33342 Stain，置于 37 $^{\circ}$ C 水浴，孵育 5~15min

②置于冰水中冷却后，4 $^{\circ}$ C 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 5  $\mu$ l PI Stain，置于冰浴或 4 $^{\circ}$ C，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：

荧光染料都存在淬灭的问题，建议染色后尽快检测。

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。

Heochst 33342 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 33342 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。

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

PI 对人体有刺激性，请注意适当防护。

为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。