



Hoechst33342/PI 双染试剂盒说明书（简化版）

（G023-1 Apoptotic Cell Hoechst 33342/PI Detection Kit, ）

一、产品简介】

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。而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，用Hoechst 33342结合PI染料对凋亡细胞进行双染色，就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（Hoechst 33342⁺⁺/PI⁺），坏死细胞为低蓝色/高红色（Hoechst 33342⁺/PI⁺⁺）。

二、试剂组成】

试剂编号	试剂组成	规格装量	保存条件
R1	Hoechst 33342 染液	1.0ml	4℃，避光
R2	Propidium Iodide （PI）	500μl	4℃，避光
R3	10×Buffer A	10 ml	4℃

三、自备仪器和试剂

荧光显微镜或流式细胞仪、低速离心机、微量移液器、1.5m L Microtube、载玻片、盖玻片

四、操作步骤：

- 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，再加入10μl Hoechst 33342 染液，混匀，37℃孵育5～15 min；
- 2、细胞于4℃，500～1000r/min离心5min弃去上清液；
- 3、加入1.0ml Buffer A工作液(用双蒸水将10×Buffer A稀释10倍)悬浮细胞，加入5μl PI染液，室温避光放置5～15min后混匀；



4、荧光显微镜观察：

Heochst 33342用氩激光激发的紫外光，激发波长为352nm，发射波长为400~500nm，产生兰色荧光；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。

5、流式细胞仪分析：

Heochst 33342用氩激光激发的紫外光，激发波长为352nm，发射波长为400~500nm，产生兰色荧光；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。分析兰色荧光对红色荧光的散点图或地形图。结果判断：在兰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。