



中 科 瑞 泰 (北 京) 生 物 科 技 有 限 公 司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

Hoechst 33342 即用型染色液 Hoechst 33342 Stain RTU Solution, 10 µg/ml

● 产品组成:

货号	名称	规格	贮存
HE1013S	Hoechst 33342 即用型染色液	10 ml	-20℃
	说明书	一份	

● 产品简介:

Hoechst 33342, 也称 bisBenzimide H 33342 或 HOE 33342, 分子式为 $C_{27}H_{28}N_6O \cdot 3HCl$, 分子量 MW561.93, CAS: 23491-52-3, 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料, 对细胞的毒性较低。Hoechst 33342 专一性地与双链 DNA 结合 (优先结合 AT), 常用于细胞核染色。染色后可以用荧光显微镜观察或流式细胞仪检测。Hoechst 33342 的最大激发波长为 346 nm (紫外激发), 最大发射波长为 460nm (蓝色荧光); Hoechst 33342 和双链 DNA 结合后, 最大激发波长为 350nm, 最大发射波长为 461nm。另外, 由于 Hoechst 33342 专一性结合 DNA, 不与 RNA 结合, 样品无需使用 RNase 处理。与 DAPI 相比, Hoechst 33342 具有更好的膜通透性, 更适合于活细胞的染色。

Hoechst 33342 和 Hoechst 33258 相比, Hoechst 33342 对细胞的毒性作用更小一些, 33258 穿透能力较 33342 弱, 染活细胞时容易被"泵出", 也就是拒染。所以一般来说 Hoechst 33258 用于细胞固定后再染色, 而 Hoechst33342 则可以对活细胞直接进行染色。

本染色液为即用型, 浓度为 10 µg/ml, 可直接用于固定细胞或组织的细胞核染色, 也可直接用于活细胞或组织的细胞核染色。

● 贮存:

-20℃避光保存, 一年有效。

● 操作步骤:

一. 固定后的细胞样品染色:

1.1 贴壁细胞:

1.1.1 取洁净盖玻片在 70%乙醇中浸泡 5 分钟或更长时间, 无菌超净台内吹干或用无菌的 PBS 洗涤三遍, 再用细胞培养液洗涤一遍。将盖玻片置于六孔板内, 种入细胞培养过夜, 生长至 50%-80% 满度。

1.1.2 刺激细胞发生凋亡后, 吸尽培养液, 加入 0.5 ml 固定液, 固定 10 分钟或更长时间(可 4℃过夜)。

1.1.3 去尽固定液, 用 PBS 洗两遍, 每次 3 分钟, 吸尽液体。洗涤时宜用摇床或手动晃动。

1.1.4 加入 0.5 ml Hoechst 33342 染色液, 37℃避光染色 10-15 分钟, 手动晃动数次。

1.1.5 去尽染色液, 用 PBS 洗两遍, 每次 3 分钟, 吸尽液体。洗涤时宜用摇床或手动晃动。

1.1.6 滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 让细胞接触封片液, 尽量避免气泡。

1.1.7 荧光显微镜使用紫外激发, 可检测到呈蓝色的细胞核。激发波长 350nm 左右, 发射波长 460nm 左右。

注: 荧光染料都存在淬灭的问题, 建议染色后尽快检测。

1.2 悬浮细胞:

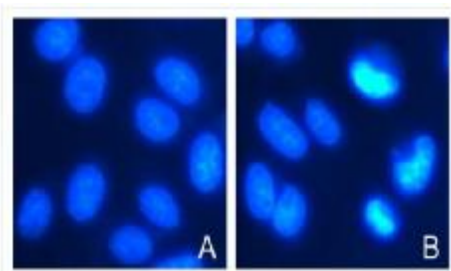
注: 本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。
中 科 瑞 泰 (北 京) 生 物 科 技 有 限 公 司 电 话: 400-699-0631 E-mail: real-times@vip.163.com <http://www.real-tims.com.cn>

- 1.2.1 500 g (2400 rpm, 下同) 离心收集凋亡处理后细胞样品于 1.5 ml 离心管内, 加入 0.5 ml 固定液, 缓缓悬起细胞, 常温固定 10 分钟或更长时间(可 4℃ 过夜)。
- 1.2.2 离心去尽固定液, 用 PBS 洗两遍, 每次 3 分钟, 洗涤期间手动晃动数次。
- 1.2.3 细胞沉淀中加入 0.5 ml Hoechst 33342 染色液, 37℃ 避光染色 10-15 分钟, 手动晃动数次。
- 1.2.4 离心收集沉淀, 重悬于 100 μ l PBS 中。
- 1.2.5 取 5 μ l 抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 加入等体积步骤 1.2.4 染色后细胞重悬液, 盖上一洁净的盖玻片, 尽量避免气泡。
- 1.2.6 荧光显微镜下紫外激发, 可检测到呈蓝色的细胞核。激发波长 350 nm 左右, 发射波长 460 nm 左右。
- 注: 荧光染料都存在淬灭的问题, 建议染色后尽快检测。

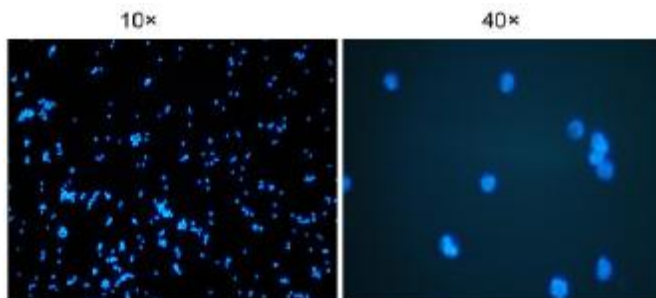
二. 活细胞染色:

- 2.1 加入适当量 Hoechst 33342 染色液, 必须充分覆盖住待染色的样品, 通常对于六孔板一个孔需加入 1 ml 染色液, 对于 96 孔板一个孔需加入 100 微升染色液。
- 2.2 在适宜于细胞培养的温度下培养 20-30 分钟。弃染色液, 用 PBS 洗涤 2-3 次即可进行荧光检测。细胞发生凋亡时, 在荧光显微镜下观察会看到凋亡细胞的细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染。

三. 实验示例:



HeLa 细胞染色图。图 A 为正常细胞 Hoechst 33342 的染色效果图。图 B 中除了正常细胞外, 还清晰可见呈现致密浓染的凋亡细胞。



操作流程: Jurkat 细胞, 计数 1×10^6 /ml; 500 g 3 min 收集 2 ml 细胞; 细胞沉淀中加入 1 ml 卡诺固定液, 常温固定 10 min; $1 \times$ PBS 漂洗两次; 细胞沉淀中加入 200 μ l Hoechst 33342 即用型染色液 (10 μ g/ml); 37 度避光染色 10 min; 离心后细胞沉淀重悬于 100 μ l $1 \times$ PBS 中; 取 5 μ l 细胞悬液滴于载玻片上, 加 5 μ l 抗荧光淬灭剂, 封片观察。