



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 33258 染色液（Hoechst Stain Solution, 10 µg/ml）

● 产品组成:

组分货号	名称	规格	贮存
HE1012S	Hoechst 染色溶液	10 ml	-20℃
	说明书	一份	

● 产品简介:

Hoechst 33258 也称 bisBenzimide H 33258 或 HOE 33258，分子式为 $C_{25}H_{24}N_6O \cdot 3HCl$ ，分子量为 533.88，CAS Number 23491-45-4。Hoechst 33258 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，常用于细胞凋亡检测，染色后可用荧光显微镜观察或流式细胞仪检测。Hoechst 33258 也用于普通的细胞核染色、DNA 染色。

Hoechst 33258 和 Hoechst 33342 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。

Hoechst 33258 的最大激发波长为 346nm，最大发射波长为 460nm，Hoechst 33258 和双链 DNA 结合后，最大激发波长为 352nm，最大发射波长为 461nm。

本 Hoechst 33258 染色液为即用型，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. 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 33258 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。

2. 悬浮细胞:

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)。

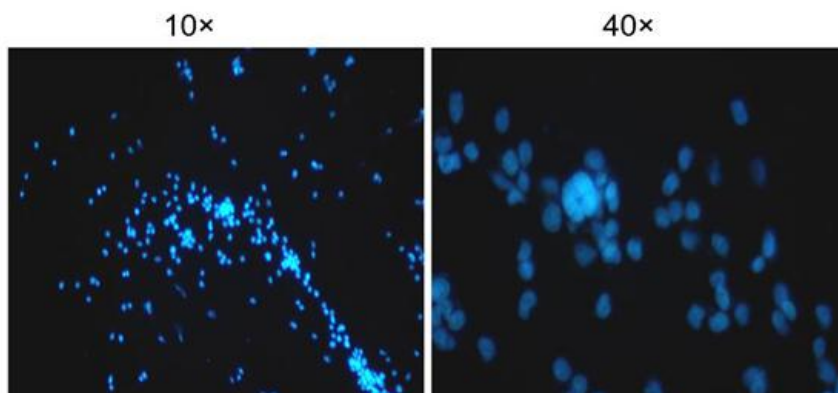
- 1.2.2 离心去尽固定液，用 PBS 洗两遍，每次 3 分钟，洗涤期间手动晃动数次。
- 1.2.3 细胞沉淀中加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液，37℃ 避光染色 10-15 分钟，手动晃动数次。
- 1.2.4 离心收集沉淀，重悬于 100 μ l PBS 中。
- 1.2.5 取 5 μ l 抗荧光淬灭封片液于载玻片上，加入等体积步骤 1.2.4 染色后细胞重悬液，盖上一洁净的盖玻片，尽量避免气泡。
- 1.2.6 荧光显微镜下紫外激发，可检测到呈蓝色的细胞核。激发波长 350 nm 左右，发射波长 460 nm 左右。

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 Hoechst33258 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 1ml 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：



操作流程：胰酶消化液消化，计数 2×10^6 /ml；500 g 3 min 收集 1.3 ml 293 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 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。