

Version 2

Code No. AG51012

CytoDet Hoechst 33342 染色液

CytoDet Hoechst 33342 Solution

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本产品是一种基于 Hoechst 33342 [2' -(4-乙氧基苯基)-5-(4-甲基-1-哌嗪基)-2,5' -双-1H-苯并咪唑三盐酸盐] 的荧光染料，广泛应用于细胞成像技术中 DNA 和细胞核染色。其检测原理是 Hoechst 33342 能够渗透细胞膜与 dsDNA 的腺嘌呤-胸腺嘧啶 (A-T) 小沟处结合，从而对细胞核染色。Hoechst 33342 本身荧光背景较低，与 dsDNA 结合后发出强烈的蓝色荧光 (最大激发光与发射光分别为 $Ex = 350\text{ nm}$, $Em = 461\text{ nm}$)。Hoechst 33342 染色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 33342 也常用于普通的细胞核染色，或常规的 DNA 染色。本产品操作简单，仅需将 Hoechst 33342 溶液稀释至合适浓度后覆盖样本，孵育一定时间后即可观察到明亮的蓝色荧光。

本产品可广泛用于活细胞、固定细胞或组织、石蜡切片的细胞核染色以及细胞凋亡和细胞周期分析。

➤ 产品组成

组分名称	AG51012
Hoechst 33342 Solution (1 mg / ml)	1 ml

➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 避光保存

运输温度：-20°C 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品是即用型染料，操作简单，染色固定细胞或石蜡切片样本时可用 PBS 或细胞培养液将其稀释至工作浓度 (0.5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，加入至细胞中，室温孵育一定时间即可观察；染色活细胞时，该溶液可直接按照一定比例加至细胞培养液中，无需收集细胞，也无需洗涤细胞，37°C 孵育一定时间即可观察。
2. 本产品可渗透细胞膜，对细胞毒性较低，适用于活细胞、固定细胞或组织、石蜡切片等多种样本的细胞核染色实验以及细胞凋亡检测。
3. 酚红和血清对 Hoechst 33342 染色无影响。

➤ 实验原理

Hoechst 33342 【2'-(4-乙氧基苯基)-5-(4-甲基-1-咪唑基)-2,5'-双-1H-苯并咪唑三盐酸盐】能够渗透细胞膜与 dsDNA 的腺嘌呤-胸腺嘧啶 (A-T) 小沟处结合，从而对细胞核染色。Hoechst 33342 本身荧光背景较低，与 dsDNA 结合后发出强烈的蓝色荧光 (最大激发光与发射光分别为 $E_x = 350 \text{ nm}$, $E_m = 461 \text{ nm}$)。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材:

PBS 或其它合适的缓冲液 (如 DPBS、细胞培养液)、细胞或组织样本。

2. 仪器:

荧光显微镜 (带紫外激发光)、桌面离心机、振荡器、移液器等。

➤ 实验前注意事项

1. Hoechst 33342 需避光保存，实验过程中注意避光操作。
2. 初次实验，可尝试稀释多种工作浓度的染色液进行染色，摸索最佳染色液工作浓度。
3. 荧光染料长时间可能会淬灭，建议染色后尽快完成检测。
4. Hoechst 33342 对人体存在一定刺激性，实验时请注意穿实验服并佩戴一次性口罩、手套进行操作。

➤ 操作方法

A. 活细胞或组织染色

1. 对于在细胞培养皿或细胞培养板中的活细胞或组织，可直接将 Hoechst 33342 Solution 按照 1:100 的比例添加至培养液中 (例如向 1 ml 培养液中加入 $10 \mu\text{l}$ Hoechst 33342 Solution，Hoechst 33342 Solution 终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$)，用移液枪轻柔吹打混匀。【注：Hoechst 33342 的浓度可根据染色效果进行调整，若染色效果弱，可提高浓度；若染色效果过强，可降低浓度。】
2. 将培养皿或细胞培养板放置于 37°C 细胞培养箱中孵育 10~20 min。
3. 使用 PBS 清洗细胞 2~3 次【注：若在不清洗的条件下成像，荧光强度可能会随时间的推移而增强】：

- ✚ 对于贴壁细胞或组织，去除细胞培养皿或细胞培养板中含染色液的上清，再加入适量 PBS 或其它合适的缓冲液，覆盖住样本即可，洗涤 2~3 次；
 - ✚ 对于悬浮细胞，离心收集细胞沉淀，去除含染色液的上清，然后用 PBS 或其它合适的缓冲液重悬细胞，离心收集细胞沉淀，如此重复洗涤 2~3 次。
4. 加入适量的 PBS 后，直接在荧光显微镜下观察，激发光为紫外光。

B. 固定细胞或组织染色

1. 对于固定的细胞或组织样本，固定后用 PBS 洗涤 2~3 次去除固定剂。【注意：若要进行免疫荧光染色，则先参照免疫荧光染色说明书进行染色，染色完毕后再参照下述步骤进行细胞核染色。】
2. 配制 10 μ g/ml Hoechst 33342 染色工作液：例如向 1 ml PBS 中加入 10 μ l Hoechst 33342 Solution (PBS : Hoechst 33342 = 100 : 1)，用移液器吹打混匀。【注：Hoechst 33342 的浓度可根据染色效果进行调整，若染色效果弱，可提高浓度；若染色效果过强，可降低浓度。】
3. 染色：
 - ✚ 对于贴壁细胞或组织，可直接在细胞培养板或载玻片上加入适量的 Hoechst 33342 染色工作液，覆盖住样本即可。室温避光孵育 5 min。
 - ✚ 对于悬浮细胞，离心收集细胞，去除上清，然后加入 1 ml Hoechst 33342 染色工作液，室温避光孵育 5 min。
4. 使用 PBS 清洗细胞 2~3 次【注：若在不清洗的条件下成像，荧光强度可能会随时间的推移而增强】：
 - ✚ 对于贴壁细胞或组织，去除含染色液的上清，再加入适量 PBS 或其它合适的缓冲液，覆盖住样本即可，洗涤 2~3 次；
 - ✚ 对于悬浮细胞，离心收集细胞沉淀，去除含染色液的上清，然后用 PBS 或其它合适的缓冲液重悬细胞，离心收集细胞沉淀，洗涤 2~3 次。
5. 加入适量的 PBS 后，直接在荧光显微镜下观察，激发光为紫外光。

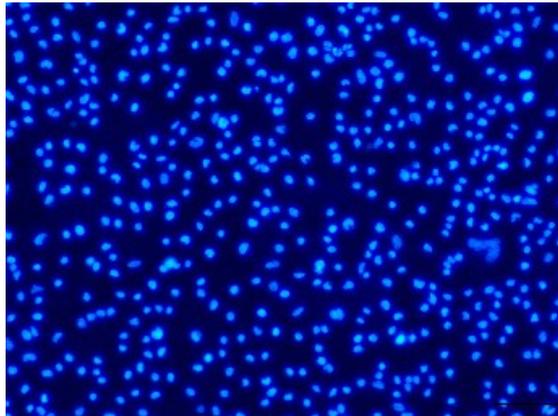
C. 石蜡切片染色

1. 在常规的包埋切片后，可以用二甲苯或其他脱蜡液进行脱蜡，梯度酒精清洗至水。
2. 用 PBS 或其它缓冲液洗涤 2~3 次，洗涤时宜用摇床或手动晃动数次，吸去 PBS。

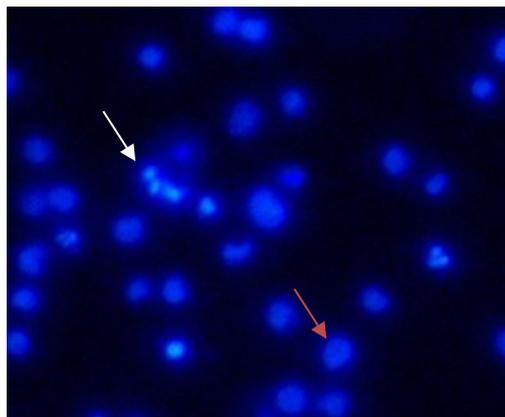
3. 配制 10 μ g/ml Hoechst 33342 染色工作液：例如向 1 ml PBS 中加入 10 μ l Hoechst 33342 Solution (PBS : Hoechst 33342 = 100 : 1)，用移液器吹打混匀。【注：Hoechst 33342 的浓度可根据染色效果进行调整，若染色效果弱，可提高浓度；若染色效果过强，可降低浓度。】
4. 染色：加入适量 10 μ g/ml Hoechst 33342 染色工作液，覆盖住样本即可，室温避光孵育 5 min。
5. 吸去染色液，然后用 PBS 或其它缓冲液洗涤 2~3 次，洗涤时宜用摇床或手动晃动数次。【注：若在不清洗的条件下成像，荧光强度可能会随时间的推移而增强。】
6. 直接在荧光显微镜下观察，激发光为紫外光。

➤ 实验例

1. 在 12 孔细胞培养板中提前一天接种 HeLa 细胞，24h 后用 10 μ g/ml 的 Hoechst 33342 染色工作液进行染色，结果如下图所示，细胞核呈现蓝色荧光。



2. 用 1ml 的 Hoechst 33342 染色工作液 (10 μ g/ml) 染色 1×10^6 个 Jurkat 活细胞，37°C 孵育 10 min，结果如下图所示，活细胞呈现淡蓝色荧光，其中含有的部分早期凋亡细胞呈现亮蓝色（红色箭头所指为正常活细胞，白色箭头所指为凋亡细胞）。



➤ 产品注意事项

1. 防污染措施:

- ❖ 本产品用于活细胞、固定细胞或组织、石蜡切片的细胞核染色，进行染色时需要注意防止细菌或真菌污染，需要使用无菌无酶的器具，操作过程中要在生物安全柜中操作，避免讲话，且需要穿实验服，戴一次性口罩和手套等防止菌污染，细菌或真菌污染会影响检测结果。

2. 染色结果不理想:

- ❖ 在初次实验时可先摸索染色工作液的最佳浓度，可根据实验需求对染色工作液的浓度在 0.5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间进行调整以获得最佳染色效果。
- ❖ 显微镜观察时出现荧光过强可尝试适当减少染色工作液浓度或缩短孵育时间。
- ❖ 显微镜观察时出现除细胞核之外的其它未知染色，可能是清洗不彻底或细胞存在污染，可尝试增加洗涤次数或检测细胞中是否存在污染。