

Version 2

Code No. AG51011

# *CytoDet* Hoechst 33258 染色液

# *CytoDet* Hoechst 33258 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

本产品是基于 Hoechst 33258 [4-(5-(4-甲基咪唑-1-基)-1H,1'H-[2,5'-联苯并[D]咪唑]-2'-基)苯酚] 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 33258 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 33258 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  $Ex = 352 \text{ nm}$ ,  $Em = 461 \text{ nm}$ )。Hoechst 33258 染色常用于细胞凋亡检测、普通的细胞核染色或常规的 DNA 染色，染色后可用荧光显微镜观察或流式细胞仪检测。本产品操作简单，仅需将 Hoechst 33258 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、细胞凋亡和细胞周期分析；由于 Hoechst 33258 对活细胞的细胞膜渗透性较差，因此对健康的活细胞染色时蓝色荧光强度较弱，对于凋亡细胞或者细胞膜受损伤的细胞，则会发出明亮的蓝色荧光；若对健康的活细胞染色时需要有明亮的蓝色荧光，可使用 *CytoDet* Hoechst 33342 Solution (Code No. AG51012)。

## ➤ 产品组成

组分名称	AG51011
Hoechst 33258 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，室温孵育一定时间后即可观察；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 孵育一定时间后即可观察。
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 33258 染色无影响。

## ➤ 实验原理

Hoechst 33258 【4-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H,1'H-[2,5'-联苯并[D]咪唑]-2'-基)苯酚】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 33258 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  $Ex = 352 \text{ nm}$ ， $Em = 461 \text{ nm}$ ）。

## ➤ 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 33258 Solution 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 33258 Solution 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 33258 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 33258 Solution，Hoechst 33258 Solution 终浓度为  $10 \mu\text{g/ml}$ ），用移液枪轻柔吹打混匀。【注：Hoechst 33258 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  $37^\circ\text{C}$  细胞培养箱中孵育 10~20 min。
3. 使用 PBS 清洗细胞 2~3 次，方法如下【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，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 μg/ml Hoechst 33258 染色工作液：例如向 1 ml PBS 中加入 10 μl Hoechst 33258 Solution ( PBS : Hoechst 33258 = 100 : 1 )，用移液器吹打混匀。【注：Hoechst 33258 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 33258 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 33258 染色工作液，室温避光孵育 5 min。
4. 使用 PBS 清洗细胞 2~3 次，方法如下【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。

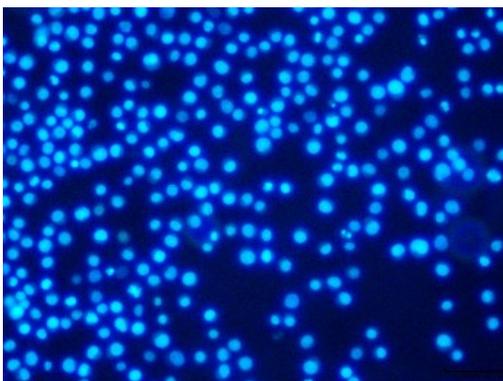
## C. 石蜡切片染色

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。

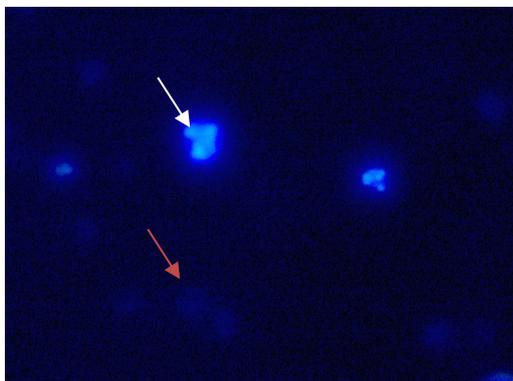
3. 配制 10  $\mu$ g/ml Hoechst 33258 染色工作液:例如向 1 ml PBS 中加入 10  $\mu$ l Hoechst 33258 Solution ( PBS : Hoechst 33258 = 100 : 1 ) , 用移液器吹打混匀。【注: Hoechst 33258 的浓度可根据染色效果进行调整, 若染色效果弱, 可提高浓度; 若染色效果过强, 可降低浓度。】
4. 染色: 加入适量 10  $\mu$ g/ml Hoechst 33258 染色工作液, 覆盖住样本即可, 室温避光孵育 5 min。
5. 吸去染色液, 然后用 PBS 或其它缓冲液洗涤 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. 用适量的 4%多聚甲醛固定液室温固定  $1 \times 10^6$  个 Jurkat, 离心去除固定液后加入适量的 PBS 洗涤两遍, 然后用 10  $\mu$ g/ml 的 Hoechst 33258 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 1 ml 的 Hoechst 33258 染色工作液 ( 10  $\mu$ g/ml ) 染色  $1 \times 10^6$  个 Jurkat 活细胞, 37°C 孵育 10 min, 结果如下图所示, 活细胞荧光强度较暗, 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，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时，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。