Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору для определения апоптоза с помощью Hoechst 33342 и PI

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору для определения апоптоза с помощью Hoechst 33342 и PI 3-9

RU

Инструкция к набору для определения апоптоза с помощью Hoechst 33342 и PI

Apoptosis Detection Kit, with Hoechst 33342 & PI — набор для флуоресцентного окрашивания клеток, позволяющий оценивать их жизнеспособность и выявлять клетки с нарушенной целостностью плазматической мембраны. Набор содержит два ДНК-связывающих красителя — Hoechst 33342 и йодид пропидия (PI), которые различаются по способности проникать через клеточную мембрану и спектральным характеристикам.

Hoechst 33342 — проникающий в клетки флуоресцентный краситель, преимущественно связывающийся с АТ-богатыми участками ДНК. Он окрашивает ядра как живых, так и мёртвых клеток и даёт синюю флуоресценцию. Йодид пропидия (PI) не проникает через интактные клеточные мембраны и окрашивает нуклеиновые кислоты клеток с нарушенной мембранной целостностью, формируя красный флуоресцентный сигнал.

Совместное применение красителей позволяет различать клетки с сохранной и нарушенной плазматической мембраной, оценивать долю нежизнеспособных клеток и исследовать изменения морфологии ядер. Набор подходит для флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии, а также для анализа адгезивных и суспензионных клеток.

Набор содержит концентрированные водные растворы Hoechst 33342 и PI, а также сухую смесь для приготовления буфера разведения. Количества реагентов достаточно для приготовления до 50 мл рабочего окрашивающего раствора.

Важное ограничение: двойное окрашивание Hoechst 33342/PI само по себе не позволяет достоверно разделить живые, апоптотические и некротические клетки. Оно выявляет мембранную проницаемость и изменения ядерной морфологии. Для специфической оценки апоптоза необходимы дополнительные маркеры, например аннексин V или активированные каспазы.

Состав набора

Компонент набора	Количество 57472 500 tests
29010, Пропидия йодид, 500 uL, 0.1 mg/mL in water	1
3N010, Hoechst 33342, синий флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот, 500 uL, 1 mg/mL in Water	1
A8215, Dilution buffer, 50 mL	1

Транспортировка: при комнатной температуре в течение 1 недели. Хранить при -20°C.

Срок хранения 12 месяцев.

Приготовление растворов

1. Растворить содержимое флакона Dilution Buffer в 50 мл дистилированной воды.
2. Приготовить рабочий раствор непосредственно перед окрашиванием, смешав компоненты в следующих пропорциях:

Компонент	На 1 мл рабочего раствора
Буфер для разведения 1×	980 мкл
Hoechst 33342, 1 мг/мл	10 мкл
Пропидия йодид, 0,1 мг/мл	10 мкл
Итого	1000 мкл

Конечные концентрации Hoechst 33342 и PI составляют 10 и 1 мкг/мл соответственно. Концентрация Hoechst 33342 может быть уменьшена до 2,5–5 мкг/мл. Точную концентрацию для конкретного типа клеток рекомендуется подбирать эмпирически.

Важно! Рабочий раствор необходимо защищать от света и использовать непосредственно после приготовления.

Меры предосторожности и ограничения

- Использовать только живые, нефиксированные клетки для оценки мембранной целостности.
- Защищать растворы красителей и окрашенные образцы от света.
- Не превышать время инкубации без предварительной оптимизации.
- Использовать средства индивидуальной защиты при работе с ДНК-связывающими красителями.
- Не интерпретировать повышенную интенсивность Hoechst как однозначное доказательство апоптоза.
- Для корректного сравнения экспериментальных групп поддерживать одинаковые концентрации красителей, продолжительность окрашивания и настройки регистрации.

Флуоресцентная микроскопия адгезивных клеток

1. Вырастить клетки на покровных стёклах, в культуральных чашках или планшетах, пригодных для флуоресцентной микроскопии.
2. После экспериментальной обработки осторожно удалить культуральную среду. При необходимости сохранить среду с отделившимися клетками для отдельного анализа.
3. Осторожно промыть клетки один раз буфером Dilution Buffer 1×.
4. Добавить достаточный объём рабочего окрашивающего раствора, чтобы полностью покрыть клетки (например, 100–200 мкл на лунку 96-луночного

планшета).

5. Инкубировать 10–15 минут при 37°C в защищённом от света месте.
6. При необходимости осторожно заменить окрашивающий раствор свежим буфером Dilution Buffer 1× для уменьшения фоновой флуоресценции.
7. Немедленно провести визуализацию на флуоресцентном микроскопе в синем и красном каналах.

Важно! Не фиксировать клетки до окрашивания: фиксация может изменять проницаемость мембран и нарушать достоверность определения жизнеспособности.

Флуоресцентная микроскопия суспензионных клеток

1. Собрать клетки центрифугированием при 300–400 × *g* в течение 5 минут.
2. Удалить супернатант и один раз промыть клетки буфером Dilution Buffer 1×.
3. Ресуспендировать клетки в рабочем окрашивающем растворе до концентрации приблизительно 0,5–1 × 10^6 клеток/мл.
4. Инкубировать 10–15 минут при 37°C, защищая от света.
5. Перенести 10–20 мкл суспензии на предметное стекло или в камеру для микроскопии.
6. Немедленно получить изображения в синем и красном каналах.

Проточная цитометрия суспензионных клеток

1. Собрать приблизительно 1×10^5–1×10^6 клеток на образец.
2. Центрифугировать при 300–400 × *g* в течение 5 минут.
3. Удалить супернатант и промыть клетки буфером Dilution Buffer 1×.
4. Ресуспендировать клетки в 500 мкл рабочего окрашивающего раствора.
5. Инкубировать 10–15 минут при 37°C в защищённом от света месте.
6. При необходимости довести объём буфером Dilution Buffer 1× до требуемого для цитометра.
7. Провести анализ как можно скорее, без фиксации образцов.

Важно! Рекомендуется использовать контроль без красителей, отдельные контроли для окрашивания Hoechst 33342 и PI, а также образец с заведомо повреждёнными клеточными мембранами.

Проточная цитометрия адгезивных клеток

1. После экспериментальной обработки собрать культуральную среду, содержащую отделившиеся клетки.
2. Осторожно отделить оставшиеся адгезивные клетки с помощью подходящего метода диссоциации.
3. Объединить отделившиеся и собранные клетки, чтобы не потерять погибшие клетки.
4. Центрифугировать при 300–400 × *g* в течение 5 минут и промыть буфером Dilution Buffer 1×.
5. Ресуспендировать клетки в 500 мкл рабочего окрашивающего раствора.
6. Инкубировать 10–15 минут при 37°C в темноте.
7. Провести анализ на проточном цитометре без предварительной фиксации.

Важно! Следует учитывать, что ферментативная или механическая диссоциация может дополнительно повреждать мембраны клеток и влиять на долю PI-положительной популяции.

Параметры регистрации флуоресценции

Параметр	Hoechst 33342	PI
Возбуждение, максимум	~350 нм	~535 нм
Эмиссия, максимум	~461 нм	~617 нм
Микроскопия	DAPI	TRITC / Texas Red
Проточная цитометрия	UV 355 нм	488 или 561 нм
Пример детекции в цитометрии	450/50 нм	610/20 или 620/30 нм

Для цитометрии необходимо наличие УФ-лазера или другого подходящего источника возбуждения Hoechst 33342. Стандартный прибор только с лазерами 405 и 488 нм может оказаться неподходящим для этого набора без дополнительной проверки чувствительности.

Интерпретация результатов

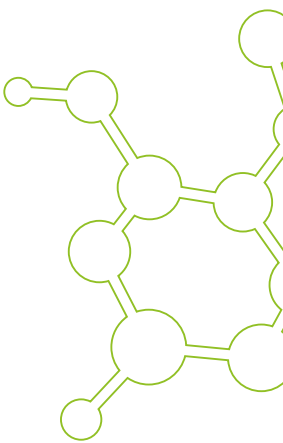
Hoechst 33342	PI	Интерпретация
+	–	Клетки с сохранной мембранной целостностью
+, яркий конденсированный сигнал	–	Возможные ранние морфологические признаки апоптоза
+	+	Клетки с нарушенной мембранной целостностью
–	+	Возможные особенности окрашивания или регистрации; требуется проверка

При микроскопии следует учитывать не только интенсивность Hoechst, но и форму ядра, конденсацию хроматина и фрагментацию ядер.

В цитометрии разделение популяций преимущественно основывается на регистрации PI, а Hoechst используется для идентификации ядросодержащих клеток. Для количественного анализа рекомендуется исключать дебрис и дублеты, а пороги флуоресценции устанавливать по контрольным образцам.

Ver. RAYSQ

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com