



Hoechst 33258 染色液（1mg/mL）说明书

货号：WGD-X-3100156

一 产品介绍

本公司生产的 Hoechst 33258 染色液（1mg/mL）是一种常用的高灵敏度、高特异性的细胞核荧光染料，其主要成分为双苯甲亚胺（bisBenzimide H 33258）。Hoechst 33258 与另一种 DNA 荧光染料 Hoechst 33342 均属于双苯酰亚胺类化合物，因此染色原理相似，均通过特异性的嵌入 DNA 双螺旋小沟中的 AT 富集区，在激发光下发出蓝色荧光。Hoechst 33258 在水溶液中的最大激发/发射波长是 346/460 nm，当与双链 DNA（dsDNA）结合后，荧光强度显著增强约 20-30 倍，但峰值波长仅轻微偏移，其最大激发/发射波长转变为 352/461 nm。

与 Hoechst 33342 不同，Hoechst 33258 染色液作为一种弱细胞膜渗透性荧光染料，很难穿透具有生物活性的健康细胞膜。加之 Hoechst 33258 对低浓度 DNA 的检测灵敏度更高，能清晰显示核外丝状或颗粒状荧光信号，因此广泛应用于基于荧光显微镜、流式细胞术等实验技术下的支原体污染快速筛查、组织切片染色、核定位与形态分析以及细胞凋亡与坏死检测等。

本产品是 Hoechst 33258 的水溶液，浓度为 1mg/mL，只需用合适的缓冲液稀释到工作液即可。Hoechst 33258 染色时可用 355 nm 激发光激发；使用流式细胞仪实验时亦可用 405 nm 激发光代替，但需调整检测通道。

二 产品目录

产品名称	规格
Hoechst 33258 染色液（1mg/mL）	1 mL

三 产品组成

组分	含量
Hoechst 33258 染色液（1mg/mL）	1 mL

四 产品用途

本产品适用于基于荧光显微镜、流式细胞术等实验技术下的支原体污染快速筛查、组织切片染色、核定位与形态分析以及细胞凋亡与坏死检测等。

五 产品特点

1. 纯度高：Hoechst 33258 纯度≥99%，确保更低杂质干扰，染色结果稳定可靠。
2. 信噪比高：对低浓度 DNA 的检测灵敏度更高，特异性更强。
3. 染色时间短：仅需 3 ~ 5 min 即可对固定后细胞核内的 DNA 进行染色。
4. 操作简便：本产品为水溶液，可直接使用或按实验需求稀释，染色后可直接观察，无需复杂洗涤步骤。
5. 适用范围广：适用于哺乳动物、植物细胞、细菌甚至支原体 DNA 染色，兼容流式细胞术、荧光显微镜等多种检测平台。

六 注意事项

1. Hoechst 33258 对光敏感，存在易淬灭问题，应尽量避光，以减缓荧光淬灭。
2. 避免细菌或真菌污染，可能会严重影响检测结果。
3. 避免反复冻融，建议 50 ~ 100 μL/管分装保存。
4. Hoechst 33258 可与 FITC、Cy3 等染料联用，但和 PI、7-AAD 的发射光谱冲突，应避免与其同时使用。
5. Hoechst 33258 在活细胞中的膜通透性较差，更适用于固定细胞、组织切片及膜受损活细胞的 DNA 染色。



6. Hoechst 33258 为潜在致突变剂，为了您的安全和健康，请穿实验服并戴口罩与一次性手套操作。
7. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

操作步骤

1. 固定细胞染色步骤：

- 1.1 Hoechst 33258 染色工作液配制：根据不同实验要求，选择无菌水或 1×PBS 缓冲液等溶液稀释 Hoechst 33258 染色液（1mg/mL），配制成 5 ~ 10 μg/mL 的 Hoechst 33258 染色工作液。
- 1.2 固定：选择合适的步骤固定并通透细胞。Hoechst 33258 对健康细胞膜的通透性较差，因此尽可能选择固定细胞后再进行后续染色试验。
- 1.3 洗涤：吸去固定液，用 1×PBS 洗涤 2 ~ 3 次，每次 3 ~ 5 min。
- 1.4 染色：加入 200 μL 染色工作液，轻轻晃动使其完全覆盖细胞，室温避光孵育 3 ~ 5 min。
- 1.5 观察：选择荧光显微镜的合适滤片进行观察。
- 注：若需要用流式细胞仪检测，需将细胞用胰蛋白酶消化重悬后再进行染色，可参考悬浮细胞复染步骤。

2. 膜受损活细胞染色步骤：

- 2.1 Hoechst 33258 染色工作液配制：根据不同实验要求，选择 1×PBS 缓冲液或培养基等溶液稀释 Hoechst 33258 染色液（1mg/mL），配制成 0.5 ~ 5 μg/mL 的 Hoechst 33258 染色工作液。
- 2.2 洗涤：加入预热后 1×PBS 洗涤 1 ~ 2 次，每次 2 min。
- 2.3 染色：加入 200 μL 染色工作液，轻轻晃动使其完全覆盖细胞，37℃避光孵育 10 ~ 15 min。
- 2.4 观察：使用荧光显微镜或流式细胞仪观察染色结果。

3. 石蜡切片染色步骤：

- 3.1 Hoechst 33258 染色工作液配制：选择 1×PBS 缓冲液稀释 Hoechst 33258 染色液（1mg/mL），配制成 2 ~ 10 μg/mL 的 Hoechst 33258 染色工作液。
- 3.2 样本准备：根据标准步骤处理样本。
- 3.3 染色：加入 1 mL 染色工作液覆盖组织样本，室温避光孵育 10 ~ 15 min（可延长至 30 min 增强信号）。
- 3.4 洗涤：染色完成后，1×PBS 轻柔冲洗 2 ~ 3 次，每次 3 ~ 5 min。
- 3.5 封片：用水溶性抗荧光淬灭封片剂封片，避免气泡。
- 3.6 观察：使用荧光显微镜观察染色结果。

储存及运输条件

-25 ~ -15℃避光保存 12 个月，冰袋运输。

常见问题及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
荧光信号弱或无信号	染料浓度过低或孵育时间不足	提高染色工作液浓度或延长孵育时间
	样本固定/通透不充分	优化固定/通透步骤，可选用 4%多聚甲醛固定液或者免疫染色通透液
	染料降解	新配染色液，避免反复冻融
染色不均匀	染色时细胞未分散均匀	孵育时可间隔 10 min 轻弹离心管；调整细胞密度≤10 ⁶ /mL
细胞毒性或形态异常	染料浓度过高（>10 μg/mL 可能影响细胞活性）	降低染料浓度（活细胞推荐 1 ~ 2 μg/mL）
	活细胞孵育时间过长	孵育时间应低于 60 min，建议孵育时间为 15 ~ 30 min
组织切片染色失败	石蜡未脱干净，染料无法渗透	二甲苯→乙醇梯度充分处理，保证彻底脱蜡



	组织过度固定，导致交联严重，染料难进入	优化固定时间；增加 0.1% Triton X-100 通透液处理通透步骤
支原体检测假阳性/ 假阴性	细胞碎片干扰	设立阴性/阳性对照，并结合 PCR 验证
	支原体信号弱	提高染料浓度（5 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ ）