

## 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光) AF488 TUNEL Assay Death Detection Kit

产品编号	产品名称	规格/价格	
PC-90021	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	20T /50T	
产品组分编号	产品组份名称	包装	包装
PC-90021-A	10 × DNase I Buffer	100ul	250ul
PC-90021-B	TdT Enzyme	20ul	50ul
PC-90021-C	Proteinase K (2 mg/mL)	40ul	100ul
PC-90021-D	DNase I (2 U/μL)	5ul	13ul
PC-90021-E	488 TUNEL Reaction Buffer	2x0.5ml	5x0.5ml
PC-90021-F	TUNEL Equilibration Buffer	2x 1ml	5ml

**保存:** -20°C避光可稳定保存 1 年, 避免反复冻融。

### 产品简介:

细胞在发生凋亡时, 会激活一些 DNA 内切酶, 这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA, 造成细胞染色体 DNA 的降解。细胞凋亡时抽提 DNA 进行电泳检测, 可以发现 180-200bp 的 DNA ladder。这种降解非常特异并有规律, 所产生的不同长度的 DNA 片段约为 180 bp-200 bp 的整数倍, 表现为琼脂糖凝胶电泳中呈现特异的梯状 Ladder 图谱。基因组 DNA 断裂时, 暴露的 3'-OH 可以在末端脱氧核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT)的催化下加上绿色荧光探针(AF488)标记的 dUTP(fluorescein-dUTP), 从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测, 这就是 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法检测细胞凋亡的原理。TUNEL 法可以选择性的检测凋亡细胞, 而非坏死细胞或因辐照和药物治疗而造成的 DNA 链断裂的细胞。TUNEL 实验中, TdT 酶催化 dUTP 掺入断裂的 DNA 链的 3'-OH 末端。抗原标记的 dUTP (如 digoxin-dUTP、生物素-dUTP), 因为它可以直接进行原位检测, 是一种更快速、直接的检测手段。

### 注意事项:

- 1、荧光染料均存在淬灭问题, 保存和使用过程中请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 2、TUNEL Equilibration Buffer 和 TUNEL Reaction Buffer 中含有 Sodium cacodylate trihydrate 和 Cobaltous chloride, 使用时请佩戴口罩、手套, 接触皮肤后, 请立即用大量水冲洗, 废液请按有毒物质处理。
- 3、本产品仅限于科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
- 4、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 所需自备材料:

PBS 缓冲液 (pH~7.4) (PC-00003); 4%多聚甲醛 (PC-00005); 牛血清白蛋白 (BSA) (PC-99029) 或正常的羊、牛血清 (PC-00001); 70%乙醇 (自选); 脱蜡溶剂 (石蜡切片样本) 等

### 使用方法 (仅供参考):

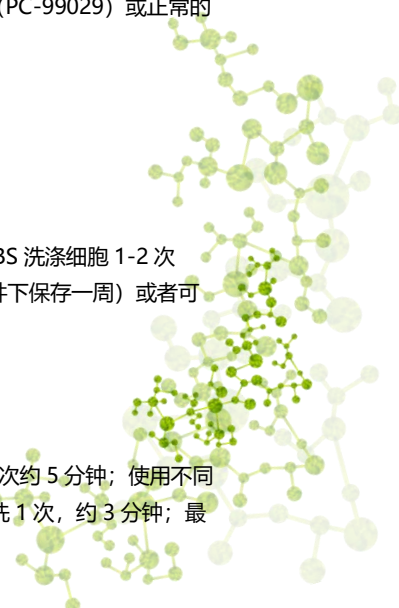
#### 一、样品准备

##### A) 细胞样品:

- 1、可选: 准备一份阴性对照样品 (加入不含 TdT 酶的 TUNEL 反应液)
- 2、PBS 洗涤细胞 1-2 次; 加入适量 4%多聚甲醛溶液, 4°C放置 30 分钟使其固定, 再次使用 PBS 洗涤细胞 1-2 次
- 3、细胞通透: 加入冰上预冷的 70%乙醇, 在 -20°C 孵育 4 h (细胞能在 70%乙醇中 -20°C 的条件下保存一周) 或者可用配制于 PBS 中的 0.2% Triton X-100 溶液进行通透细胞, 室温放置 10-20 min。
- 4、PBS 洗涤细胞 1-2 次
- 5、转至步骤二

##### B) 石蜡切片样品准备:

- 1、使用二甲苯浸泡石蜡组织切片进行脱蜡 2 次, 每次约 5 分钟; 使用无水乙醇漂洗 1-2 次, 每次约 5 分钟; 使用不同梯度的乙醇 (95%、90%、80%、70%、) 每种浓度各漂洗 1 次, 每次约 5 分钟; 使用纯水漂洗 1 次, 约 3 分钟; 最后将切片浸没于 1XPBS 中漂洗 1 次, 约 3 分钟, 用滤纸小心吸干切片样本周围的多余液体。
- 2、可选择使用免疫组化笔 (PC-90005) 在样本周围进行描绘, 以方便后续试验



3、将 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 1 × PBS 稀释，使其终浓度为 20 μg/mL (1:100)。每个样本上滴加 100 μL 稀释好的 Proteinase K 溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 2 分钟。(Proteinase K 的孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化)。

注：蛋白酶 K 可以帮助渗透组织，但延长孵育时间可能导致切片脱落，所以要最优化孵育时间长短。时间一般为 10~30 min，4 μm 左右的片子可以用 10 min，但 30 μm 左右的可用 30 min。过长易脱片、过短起不到通透效果。

4、使用 PBS 浸润清洗切片 2 次，每次约 5 分钟，用滤纸小心吸干切片样本周围的多余液体，将处理好的样品放入湿盒中保持湿润。注：这一步必须把蛋白酶 K 洗涤干净，否则会严重干扰后续的标记反应。

5、转至步骤二

C)冰冻切片样品准备：

1、将冰冻切片放置于玻片架上晾干，使用 4%多聚甲醛溶液进行室温固定 30-60 分钟

2、PBS 浸润清洗 2 次，每次约 5 分钟

3、将 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 1 × PBS 稀释，使其终浓度为 20 μg/mL (1:100)。每个样本上滴加 100 μL 稀释好的 Proteinase K 溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 20 min。(Proteinase K 的孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化)。

注：蛋白酶 K 可以帮助渗透组织，但延长孵育时间可能导致切片脱落，所以要最优化孵育时间长短。时间一般为 10~30 min，4 μm 左右的片子可以用 10 min，但 30 μm 左右的可用 30 min。过长易脱片、过短起不到通透效果。

4、使用 PBS 浸润清洗切片 2 次，每次约 5 分钟，用滤纸小心吸干切片样本周围的多余液体，将处理好的样品放入湿盒中保持湿润。注：这一步必须把蛋白酶 K 洗涤干净，否则会严重干扰后续的标记反应

5、转至步骤二

D)阳性处理(仅阳性对照进行此步骤，其他样品直接进行 TUNEL 反应步骤)

1、按 1:10 的比例用 ddH<sub>2</sub>O 将 10 × DNase I Buffer 稀释成 1 × DNase I Buffer 备用。

2、滴加 100ul 1 × DNase I Buffer 到已通透的样本上，室温平衡 5 min。

3、用 1 × DNase I Buffer 以 1:100 稀释 DNase I (2 U/μL)，使其为终浓度 20 U/mL 的工作液。

4、轻轻吸掉多余液体，加入 100 μL 浓度为 20 U/mL DNase I 工作液，室温孵育 10 min。

5、轻轻吸掉多余液体，PBS 清洗样品 2 次

## 二、配制 TUNEL 检测液

1、预先配制 TUNEL 反应混合液

	待测样品数量	1 样品	5 样品	10 样品
PC-90021-B	TdT 酶溶液(ul)	1ul	5ul	10ul
PC-90021-E	488 TUNEL Reaction Buffer (ul)	50ul	250ul	500ul

2、每个样本加入 100ul TUNEL Equilibration Buffer，孵育 5 min。

3、弃去 TUNEL Equilibration Buffer，用滤纸吸去切片样本周围多余液体，每个样本加入 50ul TUNEL 反应混合液。

a) 贴壁细胞，用盖玻片使缓冲液均匀覆盖样本。37°C 避光孵育 60 分钟。

b) 悬浮细胞，可加入微孔板中，采用微孔板振荡器进行孵育或每隔 15 分钟温和的震荡反应管，使之充分反应。

37°C 避光孵育 60 分钟。

C) 组织样本，用盖玻片或其他适当材料(主要防止蒸发)使 TUNEL 反应混合液均匀覆盖样本。将样本平放于湿盒内，37°C 恒温箱孵育 2 小时，湿盒底部铺一张含少量水的纸巾保持湿度。37°C 避光孵育 2 h。

4、去掉反应液，在 1 × PBS 的染色缸中浸泡润洗 2 次，每次 5 min。再使用适量配制于 PBS 中的 0.1% Triton X-100，其中含 5 mg/mL BSA 的缓冲液清洗样本 3 次，每次 5 min，以降低背景。

5、(可选) 复染：每个样本滴加浓度为 2 μg/mL 的 DAPI 染液，避光室温孵育 10 min。染色完后，轻轻去掉染液，并将样本在 1 × PBS 中浸泡润洗 3 次，每次 5 min。

6、(可选) 封片：将切片样本先纯水浸没 5 min，再放入 70%乙醇浸没 5 min，再 80%乙醇浸没 5 min，90%乙醇浸没 5 min，95%乙醇浸没 5 min，无水乙醇浸没 5 min，最后将切片样本置于染色缸中以新鲜的二甲苯浸泡透明化处理 2 次，每次 5 min。(通风厨中操作)。脱水完成后，擦去切片周围的液体，每个切片样本滴加 50 μL 抗荧光淬灭封片液，盖上盖玻片，用镊子的钝端轻轻敲击盖玻片，去除气泡以使封片完全。

7、用荧光显微镜或流式细胞仪观察、分析，AF488 是一种绿色荧光染料，激发波长、发射波长分别为 485 nm，515 nm(凋亡细胞应被标记上明亮的绿色荧光，没有加入 TdT 酶的阴性对照样本未被标记上荧光)。

