

一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

货号：PMK0997

保存：-20℃避光保存 12 个月，避免反复冻融。

规格：20T/50T/100T

用途：可适用细胞及组织样本的流式细胞术、荧光检测等实验检测细胞凋亡。

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。这种降解非常特异并有规律，所产生不同长度的 DNA 片段约为 180bp-200bp 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。细胞凋亡时抽提 DNA 进行电泳检测，可以发现 180-200bp 的 DNA ladder。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(SF488)标记的 dUTP(fluorescein-dUTP)，这就是 TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法检测细胞凋亡的原理。488-dUTP 标记的 DNA 可以用荧光显微镜直接观察或者用流式细胞仪定量。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 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 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。

产品内容

产品组分	20T	50T	100T	保存条件
TUNEL Equilibration Buffer	2*1ml	5ml	10ml	-20℃避光
TUNEL Reaction Buffer	1ml	2*1.5ml	6ml	-20℃避光
TdT Enzyme	20ul	50ul	100ul	-20℃
Proteinase K (2 mg/mL)	40ul	100ul	200ul	-20℃
DNase I (2 U/μL)	5ul	13ul	26ul	-20℃
10 × DNase I Buffer	100ul	260ul	500ul	-20℃

自备材料：

PBS 缓冲液(pH^{7.4})；4%多聚甲醛；牛血清白蛋白 (BSA) 或正常的羊、牛血清；70%乙醇(自选)；脱蜡溶剂(石蜡切片样本)

操作步骤：

1.样品的准备：

a) 细胞样品的准备：

- 1) 可选：准备一份阴性对照样本（加入不含 TdT 酶的 TUNEL 反应液）。
- 2) PBS 清洗细胞两次。
- 3) 细胞固定：加入适量 4% 多聚甲醛(pH 7.4)溶液，4℃ 放置 30 min。
- 4) PBS 清洗细胞两次。
- 5) 通透细胞：加入冰上预冷的 70%乙醇，在-20℃孵育 4 h。细胞能在 70%乙醇中-20℃的条件下保存一周。或者细胞可用配制于 PBS 中的 0.2% Triton X-100 溶液通透，室温放置 20 min。

产品说明书

6) PBS 清洗细胞两次。

b) 石蜡组织切片的准备:

1) 室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片 2 次, 每次 5 min, 以彻底脱掉石蜡。注: 二甲苯有毒, 易挥发, 请在通风橱中进行此操作。

2) 室温下, 将切片样本浸没于无水乙醇中漂洗 2 次, 每次 5 min。

3) 室温下, 将切片样本连续浸没在不同浓度梯度的乙醇 (95%、90%、80%、70%) 中, 每种浓度各漂洗 1 次, 每次 5 min。

4) 室温下, 将切片浸没于纯水中漂洗 1 次, 每次 3 min, 再将切片浸没于 1×PBS 中漂洗 1 次, 每次 3 min, 用滤纸小心吸干切片样本周围多余液体。

5) 用免疫组化笔在切片样本周围描绘样品轮廓, 以便下游通透与标记。

6) 按 1:100 的比例, 将 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 1×PBS 稀释, 使其终浓度为 20 μg/mL。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。

7) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min, 用滤纸吸去多余的液体, 将处理好的样品放在湿盒中保持湿润。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。

c) 冰冻组织切片样品的准备:

1) 将冰冻切片放置于室温的片架上, 室温 20 min, 晾干。

2) 将载玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液 (in PBS) 中, 室温固定 30 min。

3) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min。

4) 用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。

5) 按 1:100 的比例, 将 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 1×PBS 稀释, 使其终浓度为 20 μg/mL。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 10 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, 需摸索最佳时间。过长易脱片、过短起不到通透效果。

6) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min, 用滤纸吸去多余的液体, 将处理好的样品放在湿盒中保持湿润。

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 ddH₂O 将 10×DNase I Buffer 稀释成 1×DNase I Buffer 备用。

2) 滴加 100 μL 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/uL), 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 uL 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

2. 配制 TUNEL 检测液:

1) 预先配制 TUNEL 反应混合液: 每个样本需要已加入 1 uL TdT 酶的 50 uL TUNEL 反应缓冲液。

待测样品数量	1	5	10
TdT 酶溶液(uL)	1	5	10
TUNEL Reaction Buffer (uL)	50	250	500

2) 每个样本加入 100 uL TUNEL 平衡缓冲液, 孵育 5 min。

3) 弃去平衡缓冲液, 用滤纸小心吸去切片样本周围的多余液体, 每个样本加入 50 uL 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 min。

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 min 温和的震荡反应管, 使之充分反应。37°C 避光孵育 60 min。

c) 组织样本, 用盖玻片使缓冲液均匀覆盖样本。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。

产品说明书

- 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 ug/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 uL 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，TUNEL Reaction Buffer 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)。

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，请立即有大量水冲洗，废液请按有毒物质处理。
- 3) 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。
- 4) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品：

PMK1300 考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液
PMK053 GAPDHmAb-HRP conjugated
PMK0312 抗体稀释液 PMK1700PBST 缓冲液
PMK1020 IPTG 溶液 (50mg/ml)
PMK1010 30%丙烯酰胺 (29:1)
PMK1070 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液
PMK0012 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒
更多产品详情了解，请关注公众号：

