

## 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）

**货号：**PMK0998。

**保存：**-20℃避光保存12个月，避免反复多次冻融。

**规格：**20T/50T/100T。

**适用样本：**贴壁细胞，悬浮细胞，石蜡包埋组织切片，冰冻切片。

**应用实验：**适用细胞及组织样本的流式细胞术、荧光检测等实验。

### 产品简介：

细胞凋亡中，基因组DNA断裂时产生大量的粘性3'-OH末端，可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT)的催化下，将脱氧尿苷三磷酸核苷酸(dUTP)和荧光素形成的衍生物标记到DNA暴露的3'-OH末端，从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行凋亡细胞的检测，这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated

Nick end labeling, TUNEL)。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有DNA的断裂，因而没有3'-OH形成，很少能够被染色。由此，TUNEL成为了检测DNA片段化(细胞凋亡)的最常用方法。本试剂盒荧光信号检测通道为红色通道(Ex/Em=590nm/617nm)。

### 产品内容：

| 试剂盒组分                       | 规格    |       |       | 储存条件       |
|-----------------------------|-------|-------|-------|------------|
|                             | 20T   | 50T   | 100T  |            |
| TdT Equilibration Buffer    | 9ml   | 20ml  | 40ml  | -20℃       |
| TdT 酶                       | 200ul | 500ul | 1mL   | -20℃       |
| Labeling Solution(Fluor594) | 400uL | 1ml   | 2ml   | -20℃, 避光保存 |
| Fixation Buffer             | 6mL   | 15mL  | 30mL  | -20℃       |
| Permeabilization Buffer     | 6mL   | 15mL  | 30mL  | -20℃       |
| Stop Solution               | 20mL  | 50mL  | 100mL | -20℃       |

### 自备仪器耗材：

#### 1) 试剂

PBS (含1%BSA) 缓冲液 (pH7.2~7.4)，目的是减少离心造成的细胞损失。

#### 2) 仪器

流式细胞仪、离心机。

### 对照设置

阴性对照：排除细胞本底、药物处理等原因产生荧光背景以及非特异性染色造成的影响。准备一组细胞作为阴性对照，第8步标记工作液配制时不添加TdT酶，其余操作与实验组相同。

### 实验步骤：

1. 收集细胞并进行计数，每组取 $1 \times 10^6$ 个细胞， $300 \times g$ 离心5min，弃上清。

注：若样本为贴壁细胞，凋亡细胞会有部分悬浮于上清中，上清中的细胞也要收集。

2. 加入200  $\mu$ LPBS (含1%BSA) 重悬细胞，加入200uL Fixation Buffer，室温固定60min (推荐使用摇转方式，或每15min混匀一次)。

3. 加入1mL PBS (含1%BSA)， $600 \times g$ 离心5min，弃上清。

4. 加入200uL Permeabilization Buffer，冰上破膜10min。

## 产品说明书

注：破膜温度过高或者时间过久会导致细胞破碎，因此建议Permeabilization Buffer解冻后放置在4℃，待使用前取出；另外破膜时间最长不要超过15min。

5. 加入1-2mL PBS（含1%BSA）终止破膜，轻轻吹打混匀后，600×g离心5min，弃上清。
6. 加入200uL TdT Equilibration Buffer，轻轻吹打混匀，37° C 平衡15min。
7. 600×g离心5min，弃上清，收集细胞沉淀。
8. 按照分组参考下表配制标记工作液，每个样本加入100uL反应液（充分混匀，现配现用）。

| 组分                       | 检测样本 | 阴性对照 |
|--------------------------|------|------|
| TdT Equilibration Buffer | 70ul | 80ul |
| Labeling Solution        | 20ul | 20ul |
| TdT Enzyme               | 10ul | 0ul  |

注：

- ①TdT Equilibration Buffer使用前，室温静置直至完全溶解。冰冻的平衡液融化后可能会出现钴盐结晶，此为正常现象。使用前涡旋混匀。
- ②Labeling Solution使用前，请置于冰上溶解，待完全溶解后离心，用枪头吹打混匀。
- ③TdT酶对温度较敏感，请严格保存于-20℃，使用前取出，使用后立即放回。
- ④配制标记工作液时，建议不要涡旋。
9. 37℃避光孵育60min（每20min轻轻摇晃混匀细胞）。
10. 加入1mL Stop Solution轻轻吹打混匀，室温静置5min，加入300~500uL PBS(含1%BSA)，600×g 离心5min，弃上清。
11. 加入200uL PBS（含1%BSA）重悬细胞，上机检测。（为避免荧光淬灭，请尽快上机检测）

### 注意事项：

1. 本产品仅限于专业人员用于科学研究，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。
2. 为了您的安全和健康，操作时必须戴口罩、手套、实验服和其它生化实验室防护措施。
3. 用于该试剂盒的检测样本最低细胞数目不低于 $5 \times 10^5$ 个。
4. 实验中需要重悬细胞的步骤，用移液器轻轻吹打细胞10-20次，吹打时请勿将枪头中的液体完全吹出，避免造成细胞损伤和产生过多的气泡。
5. 离心去上清的操作要小心谨慎，避免造成细胞损失。
6. Labeling Solution 和TdT酶应避免反复冻融和涡旋操作。

### 相关产品：

- PMK0872 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(增强型)
- PMK0988 Annexin V-fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒
- PMK0996 线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1 法）
- PMK0997 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

更多产品详情了解，请关注公众号：

