

TUNEL Andy Fluor™ 488 Apoptosis Detection Kit

——TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒

| 产品货号 | 包装规格 |
|-------------|-------------|
| A050 | 50 次 |

储存条件：-20℃，避光保存。

激发/发射波长：Andy Fluor 488: 495/520 nm

产品说明书

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编：510663
电话：4006-020-200
邮箱：sales@igenebio.com
网址：www.genecopoeia.com www.igenebio.com

© 2016 GeneCopoeia, Inc.

TUNEL Andy Fluor™ 488 Apoptosis Detection Kit

产品货号: A050

试剂盒组份:

| 组份 | 试剂名称 | 包装 | 浓度 | 储存条件 |
|------|-----------------------------|--------|--------------|-------------|
| 组份 A | TdT reaction buffer | 8 ml | 1×solution | -20 °C, 避光。 |
| 组份 B | TdT enzyme | 100 µl | 15 U/µl | |
| 组份 C | Biotin-11-dUTP | 50 µl | 50×solution | |
| 组份 D | Andy Fluor 488-Streptavidin | 50 µl | 100×solution | |
| 组份 E | DNase I | 10 µl | 2 U/µl | |
| 组份 F | DNase I buffer | 1 ml | 1×solution | |
| 组份 G | Proteinase K | 50 µl | 50×solution | |

注: 按照推荐的储存条件保存有效期为 1 年。

产品介绍

TUNEL细胞凋亡检测是一种简便、快速、灵敏的细胞凋亡检测方法。该方法用来检测细胞在凋亡晚期细胞核DNA的断裂情况。其原理是生物素（Biotin）标记的dUTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT Enzyme）的作用下,可以连接到凋亡细胞中断裂的DNA 的3'-OH 末端,通过生物素-链霉亲和素放大系统,使荧光素标记的链霉亲和素与生物素结合,从而可用荧光显微镜检测。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,很少能够被标记。

本试剂盒采用 Andy Fluor™ 高性能荧光染料代替传统的荧光染料,具有荧光信号强,染料稳定性好,抗淬灭能力强等优点。本试剂盒适用于组织样本（石蜡包埋、冰冻和超薄切片）和细胞样本（细胞涂片或爬片）的凋亡原位检测。

实验所需耗材（不包含在试剂盒中）

- PBS
- 含 4%甲醛的 PBS
- 含 0.2% Triton X-100 的 PBS
- 含 3% BSA 的 PBS
- Staining buffer: 0.6 M NaCl, 60 mM 柠檬酸钠, 0.1% Triton X-100, 1% BSA, pH 7.4
- Hoechst 33342 (产品货号: C005, C006)
- 抗荧光淬灭封片液
- 脱蜡溶剂 (可选)

操作步骤

样品准备

1. 细胞样本或冷冻组织切片

注意：凋亡细胞可能容易脱落，在洗涤过程中容易损失脱落的细胞。如果需要检测脱落细胞的凋亡情况，可以收集细胞上清液，按照悬浮细胞的操作方法进行细胞凋亡检测。

- 1.1 用 PBS 洗涤细胞或组织切片，重复一次。
- 1.2 用含 4% 甲醛的 PBS (PH7.4) 固定细胞或组织切片，4℃ 孵育 30 分钟。（对于固定的冷冻组织切片可以省略此步骤）
- 1.3 用 PBS 洗涤细胞或组织切片，重复一次。
- 1.4 用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 进行通透处理，室温孵育 30 分钟。
- 1.5 用 PBS 洗涤细胞或组织切片，重复一次。

2. 石蜡包埋组织切片

2.1 按照如下表格对石蜡切片进行脱蜡、水化处理。

| | | | | | | | | |
|-------|-------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 二甲苯 | 二甲苯 | 100% EtOH | 100% EtOH | 95% EtOH | 85% EtOH | 75% EtOH | 1X PBS | 1X PBS |
| 5 min | 5 min | 5 min | 5 min | 5 min | 3 min | 3 min | 5 min | 5 min |

- 2.2 用 PBS 轻轻润洗切片，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体。
- 2.3 准备 1×蛋白酶 K 溶液。用 PBS 按照 1:50 比例稀释 50×蛋白酶 K (组份 G)。
- 2.3 每个样本上滴加 50 μl 1×蛋白酶 K 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 30 分钟。**注意：**根据不同组织切片的类型，可能需要优化 Proteinase K 孵育的时间和温度
- 2.4 用 PBS 润洗切片二次，每次 5 分钟。

准备阳性对照（可选）

- 3.1 用去离子水润洗细胞，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体。
- 3.2 加入 50 μl DNase I buffer (组份 F) 到固定的细胞中，室温孵育 5 分钟。
- 3.3 按照如下表格制备 DNase I 溶液，混合均匀。**注意：**剧烈摇动会导致 DNase I 变性，请混合时要小心。

| 试剂 | 样品数量 | | |
|-----------------------|-------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 |
| DNase I (组份 E) | 1 µl | 2 µl | 3 µl |
| DNase I buffer (组份 F) | 49 µl | 98 µl | 147 µl |
| 总体积 | 50 µl | 100 µl | 150 µl |

3.4 轻叩掉液体，每个样本上滴加 50 µl DNase I 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 30 分钟。

3.5 用去离子水润洗细胞，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体。

标记与检测

4.1 每个样本滴加 100 µl TdT reaction buffer (组份 A)，使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 10 分钟。

4.2 按照如下表格，制备 TdT 反应混合液，现用现配，注意避光。

| 试剂 | 反应数量 | | | | |
|---------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 4 | 5 | 10 |
| TdT reaction buffer | 47 µl | 94 µl | 188 µl | 235 µl | 470 µl |
| TdT enzyme | 2 µl | 4 µl | 8 µl | 10 µl | 20 µl |
| Biotin-11-dUTP | 1 µl | 2 µl | 4 µl | 5 µl | 10 µl |
| 总体积 | 50 µl | 100 µl | 200 µl | 250 µl | 500 µl |

注意：反应液最好根据计算好的反应数量集中配制，再分别加到各样本上，避免因每个样本单独配制而产生的试剂损耗，TdT 酶反应液如需短暂保存时，请置于冰上。

阴性对照体系：准备一份不含 TdT 酶的对照反应混合液，用 dH₂O 替代 TdT 酶。

4.3 用滤纸小心吸掉 TdT reaction buffer，往每个样本滴加 50 µl TdT 反应混合液，使混合液完全覆盖整个样本。

4.4 用塑料盖玻片盖在细胞上以确保 TdT 反应混合液均匀覆盖细胞或组织切片样本。

4.5 将含样本的载玻片置于密闭的湿盒内，在 37℃ 孵育 60 分钟，注意避光。对于组织切片样本，孵育时间可能需要 2 小时。

4.6 移除塑料盖玻片，用含有 3%BSA 的 PBS 润洗细胞两次，每次 5 分钟。

4.7 按照如下表格，制备 Andy Fluor™ 488-Streptavidin 染色液。

| 试剂 | 反应数量 | | | | |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | 1 | 2 | 4 | 5 | 10 |
| Andy Fluor 488-Streptavidin | 1 µl | 2 µl | 4 µl | 5 µl | 10 µl |
| Staining buffer | 99 µl | 198 µl | 396 µl | 495 µl | 990 µl |
| 总体积 | 100 µl | 200 µl | 400 µl | 500 µl | 1000 µl |

- 4.8 每个样本中滴加 100 μ l Andy Fluor™ 488-Streptavidin 染色液，室温孵育 30 分钟，注意避光。对于组织切片样本，孵育时间可能需要 1 小时。
- 4.9 用含有 3%BSA 的 PBS 润洗细胞两次，每次 5 分钟。
- 4.10 Hoechst 33342 染色液复染细胞核，室温避光孵育 10 分钟。洗去 Hoechst 33342 染色液，加适量体积的抗荧光淬灭封片液，用盖玻片封闭。
- 4.11 在荧光显微镜下观察样本，绿色荧光选用 FITC 滤光片；蓝色荧光选用 DAPI 滤光片。凋亡细胞的细胞核呈现蓝色和绿色荧光；未凋亡细胞的细胞核只呈现蓝色荧光。

流式细胞仪检测悬浮细胞（可选）

- 5.1 将 $3-5 \times 10^6$ 个细胞用 PBS 在 4℃ 离心（300 \times g）洗涤两次。
- 5.2 用含 4% 甲醛的 PBS（PH7.4）固定细胞，4℃ 孵育 30 分钟。
- 5.3 细胞用 PBS 在 4℃ 离心（300 \times g）洗涤两次。
- 5.4 用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 进行通透处理，室温孵育 30 分钟。
- 5.5 细胞用 PBS 在 4℃ 离心（300 \times g）洗涤两次。然后重悬在 1ml PBS 中。
- 5.6 转移 2×10^6 个细胞至一个 1.5 ml 的微量离心管。
- 5.7 300 \times g 离心 10 分钟，去上清，并用 100 μ l TdT reaction buffer（组份 A）重悬。室温孵育 5 分钟。
- 5.8 按照如下表格，制备 TdT 反应混合液，现用现配，注意避光。

| 试剂 | 反应数量 | | | | |
|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 1 | 2 | 4 | 5 | 10 |
| TdT reaction buffer | 47 μ l | 94 μ l | 188 μ l | 235 μ l | 470 μ l |
| TdT enzyme | 2 μ l | 4 μ l | 8 μ l | 10 μ l | 20 μ l |
| Biotin-11-dUTP | 1 μ l | 2 μ l | 4 μ l | 5 μ l | 10 μ l |
| 总体积 | 50 μ l | 100 μ l | 200 μ l | 250 μ l | 500 μ l |

注意：反应液最好根据计算好的反应数量集中配制，再分别加到各样本上，避免因每个样本单独配制而产生的试剂损耗，TdT 酶反应液如需短暂保存时，请置于冰上。

阴性对照体系：准备一份不含 TdT 酶的对照反应混合液，用 dH₂O 替代 TdT 酶。

- 5.9 细胞在 300 \times g 离心 10 分钟，去上清并把沉淀重悬在 50 μ l TdT 反应混合液中，37℃ 孵育 60 分钟，避光。每隔 15 分钟用微量移液器轻轻重悬细胞。
- 5.10 加入 1ml 20 mM EDTA 终止反应，用微量移液器轻柔混匀。
- 5.11 300 \times g 离心 10 分钟，去上清并把沉淀重悬于 1ml 含有 3%BSA 的 PBS，重复一次。

5.12 按照如下表格，制备 Andy Fluor™ 488-Streptavidin 染色液。

| 试剂 | 反应数量 | | | | |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | 1 | 2 | 4 | 5 | 10 |
| Andy Fluor 488-Streptavidin | 1 µl | 2 µl | 4 µl | 5 µl | 10 µl |
| Staining buffer | 99 µl | 198 µl | 396 µl | 495 µl | 990 µl |
| 总体积 | 100 µl | 200 µl | 400 µl | 500 µl | 1000 µl |

5.13 细胞在 300×g 离心 10 分钟，去上清并把沉淀重悬在 100 µl Andy Fluor™ 488-Streptavidin 染色液，室温孵育 30 分钟，注意避光。

5.14 300×g 离心 10 分钟，去上清并把沉淀重悬于 1ml 含有 3%BSA 的 PBS，重复一次。

5.15 300×g 离心 10 分钟，去上清，细胞重悬于 0.5 ml 用 PBS 新鲜配制的 5 µg/ml PI 溶液中，其中包含 250 µg 无 DNA 酶的 RNA 酶 A。

5.16 室温避光孵育 30 分钟。

5.17 用流式细胞仪分析，绿色荧光选用 FITC 通道；红色荧光选用 PI 通道。

实验案例

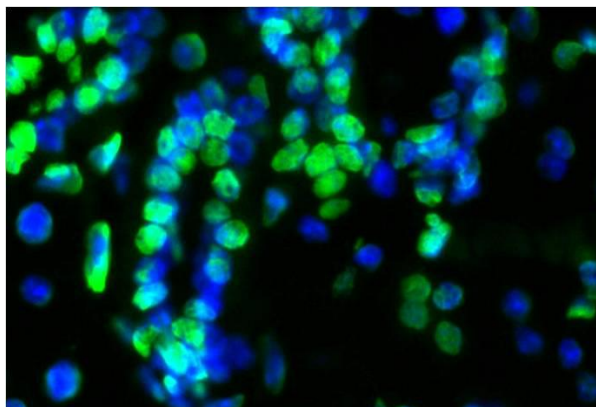


图 1：使用本试剂盒进行老鼠舌组织细胞凋亡检测结果示意图

© 2016, GeneCopoeia, Inc.

广州易锦生物技术有限公司
 广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号
 广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编：510663

电话：4006-020-200

邮箱：sales@igenebio.com

网址：www.genecopoeia.com (英文) www.igenebio.com (中文)