

TUNEL Andy Fluor™ 647 Apoptosis Detection Kit

——TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒

产品货号	包装规格
A052	50 次

储存条件：-20℃，避光保存。

激发/发射波长：Andy Fluor 647: 650/665 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.abpbio.com www.igenebio.com

© 2015 GeneCopoeia, Inc.

TUNEL Andy Fluor™ 647 Apoptosis Detection Kit

产品货号: A052

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 647-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	376 µl	470 µl
TdT enzyme	2 µl	4 µl	8 µl	16 µl	20 µl
Biotin-11-dUTP	1 µl	2 µl	4 µl	8 µl	10 µl
总体积	50 µl	100 µl	200 µl	400 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™ 647-Streptavidin 染色液。

试剂	反应数量				
	1	2	4	5	10
Andy Fluor 647-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™ 647-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，红色荧光选用 Cy5 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红色荧光；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×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×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×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×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	376 μ l	470 μ l
TdT enzyme	2 μ l	4 μ l	8 μ l	16 μ l	20 μ l
Biotin-11-dUTP	1 μ l	2 μ l	4 μ l	8 μ l	10 μ l
总体积	50 μ l	100 μ l	200 μ l	400 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×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×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™ 647-Streptavidin 染色液。

试剂	反应数量				
	1	2	4	5	10
Andy Fluor 647-Streptavidin	1 μ l	2 μ l	4 μ l	5 μ l	10 μ l
Staining buffer	99 μ l	198 μ l	396 μ l	495 μ l	990 μ l
总体积	100 μ l	200 μ l	400 μ l	500 μ l	1000 μ l

5.13 细胞在 300 \times g 离心 10 分钟，去上清并把沉淀重悬在 100 μ l Andy Fluor™ 647-Streptavidin 染色液，室温孵育 30 分钟，注意避光。

5.14 300 \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。

5.15 300 \times 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 μ g/ml PI 溶液中，其中包含 250 μ g 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，Andy Fluor™ 647 荧光信号选用 Cy5 通道；PI 荧光信号选用 PI 通道。

实验案例

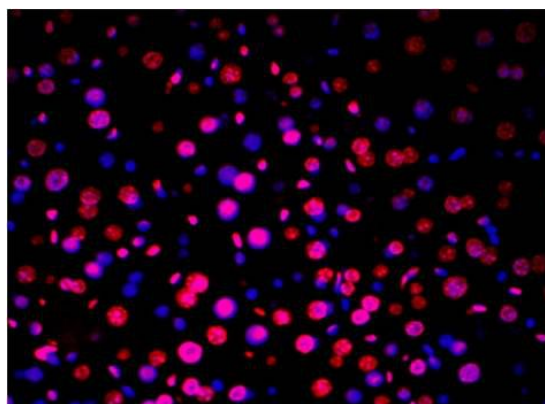


图 1：使用本试剂盒进行老鼠舌组织细胞凋亡检测结果图

© 2015, 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.abpbio.com（英文） www.igenebio.com（中文）