

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（远红荧光）

产品描述:

细胞凋亡的一个显著特点是细胞染色体 DNA 的降解，这是一个较普遍的现象。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 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，本试剂盒采用 TUNEL 法，应用末端脱氧核糖核苷酸转移酶(Terminal DeoxynucleotidylTransferase,TdT)在凋亡细胞断裂 DNA 的 3'-OH 末端催化掺入 EZ640-dUTP。640-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。

订购信息:

产品名称	货号	规格	价格
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（远红荧光）	YL0038-1	20T	1880
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（远红荧光）	YL0038-2	50T	3480

产品组分:

组分	20T	50T
A.TUNELEquilibrationBuffer	2×1mL	5mL
B.EZ640TUNELReactionBuffer	2×0.5mL	5×0.5mL
C.TdTEnzyme	20μL	50μL
D.ProteinaseK(2mg/mL)	40μL	100μL
E.DNaseI(2U/μL)	5μL	13μL
F.10×DNaseIBuffer	100μL	260μL

运输与保存:

蓝冰运输。-20℃保存；组分 B 需避光保存于-20℃，避免反复冻融。有效期见外包装。

【注】：组分 A、B 中含有有毒、致癌成分 Sodiumcacodylatetrihydrate 和 Cobaltouschloride，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。

实验材料（自备）

PBS 缓冲液（pH~7.4）

4%多聚甲醛（inPBS）

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.样本准备:

细胞样品

- （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 2 次。
- （3）细胞固定：加入适量 4%多聚甲醛(pH7.4)溶液，4℃放置 30min。
- （4）PBS 清洗细胞 2 次。

(5) 通透细胞: 加入冰上预冷的 70%乙醇, 在-20°C 孵育 4h。细胞能在 70%乙醇中-20°C 的条件下保存一周。或者细胞可用配制于 PBS 中的 0.2%TritonX-100 溶液通透, 室温放置 20min。

(6) PBS 清洗细胞 2 次。

石蜡组织切片

(1) 室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片 2 次, 每次 5min, 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 5min。

(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 5min。

(4) 室温下, 将切片浸没于纯水中漂洗 1 次, 每次 3min, 再将切片浸没于 1×PBS 中漂洗 1 次, 每次 3min, 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 2mg/mL 的 ProteinaseK 溶液用 1×PBS 稀释, 使其终浓度为 20μg/mL。每个样本上滴加 100μL 稀释好的 ProteinaseK 溶液, 使溶液覆盖全部样本区域, 室温孵育 20min (ProteinaseK 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 10~30min, 4μm 左右的片子可以用 10min, 但 30μm 左右的可用 30min。过长易脱片、过短起不到通透效果。

(7) PBS 浸润清洗切片 2 次, 每次 5min, 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标记反应。

冰冻组织切片

(1) 将冰冻切片放置于室温的片架上, 室温 20min, 晾干。

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

(3) PBS 浸润清洗切片 2 次, 每次 5min。

(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 2mg/mL 的 ProteinaseK 溶液用 1×PBS 稀释, 使其终浓度为 20μg/mL。每个样本上滴加 100μL 稀释好的 ProteinaseK 溶液, 使溶液覆盖全部样本区域, 室温孵育 10min (ProteinaseK 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 10~30min, 4μm 左右的片子可以用 10min, 但 30μm 左右的可用 30min。过长易脱片、过短起不到通透效果。

(6) PBS 浸润清洗切片 2 次, 每次 5min, 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。
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×DNaseI Buffer 稀释成 1×DNaseI Buffer 备用。

(2) 滴加 100μL 1×DNaseI Buffer 到已通透的样本上, 室温平衡 5min。

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

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

(5) 轻轻吸掉多余液体, PBS 清洗样品 2 次。

2. TUNEL 反应:

(1) 每个样本加入 100μL TUNEL 平衡缓冲液, 孵育 5min。

(2) 预先配制 TUNEL 反应混合液: 每个样本需要已加入 1μL TdT 酶的 50μL TUNEL 反应缓冲液。 (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 50μL 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 60min。

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 15min 温和的震荡反应管, 使之充分反应。37°C 避光孵育 60min。

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 2h, 湿盒底部铺一张含少量水的纸巾保持湿度。37°C 避光孵育 2h。

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

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

(6) (可选) 封片: 将样本先纯水浸没 5min, 再放入 70%乙醇浸没 5min, 再 80%乙醇浸没 5min, 90%乙醇浸没 5min, 95%乙醇浸没 5min, 无水乙醇浸没 5min, 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 5min。(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 $50\mu\text{L}$ 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, EZ640 与 Cy5 染料的光谱类似, 激发波长、发射波长分别为 642nm, 662nm (凋亡细胞应被标记上明亮的红色荧光, 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. 本产品仅限于科学实验研究使用, 不得用于临床诊断、治疗等领域。
2. 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。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品推荐:

细胞转染试剂 (高效)。(货号: YL0026)

无血清细胞冻存液。(货号: YH0027)

云贺生物