



## TUNEL Andy Fluor™ 488 Apoptosis Detection Kit

产品货号	包装规格
C044	50 次

储存条件：-20°C 保存。

激发/发射波长：Andy Fluor 488: 495/520 nm

## 产品说明书

晶科德生物科技（武汉）有限公司

Jinkede Biotechnology(Wuhan) Co.,Ltd

邮编：430000

电话：400-662-6996

网址：[www.genecodex-bio.cn](http://www.genecodex-bio.cn)

## TUNEL Andy Fluor™ 488 Apoptosis Detection Kit

货号：C044

### 试剂盒组分

组分	产品名称	包装	保存条件
C044A	TdT Equilibration buffer	9 mL	-20℃
C044B	TdT enzyme	250 µL	-20 °C
C044c	Labeling 488-dUTP solution	500 µL	-20 °C
C044D	DNase I	13 µL	-20 °C
C044E	DNase I buffer	700 µL	-20 °C
C044F	Proteinase K	1 mL	-20 °C
C044G	DAPI Reagent(25µg/mL)	250 µL	-20 °C

### 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。

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°C 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  $\mu$ l 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 $\mu$ l	94 $\mu$ l	188 $\mu$ l	376 $\mu$ l	470 $\mu$ l
TdT enzyme	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	8 $\mu$ l	16 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Biotin-11-dUTP	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L	4 $\mu$ l	8 $\mu$ l	10 $\mu$ l
总体积	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	400 $\mu$ l	500 $\mu$ 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 dH<sub>2</sub>O 替代 TdT 酶。

4.3 用滤纸小心吸掉 TdT reaction buffer，往每个样本滴加 50  $\mu$ l 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°C 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™ 594-Streptavidin 染色液。

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

4.8 每个样本中滴加 100  $\mu$ l Andy Fluor™ 594-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 Texas Red 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<sup>6</sup> 个细胞用 PBS 在 4°C 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°C 孵育 30 分钟。

5.3 细胞用 PBS 在 4°C 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°C 离心 (300×g) 洗涤两次。然后重悬在 1ml PBS 中。
- 5.6 转移 2×10<sup>6</sup> 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 μl 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 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。

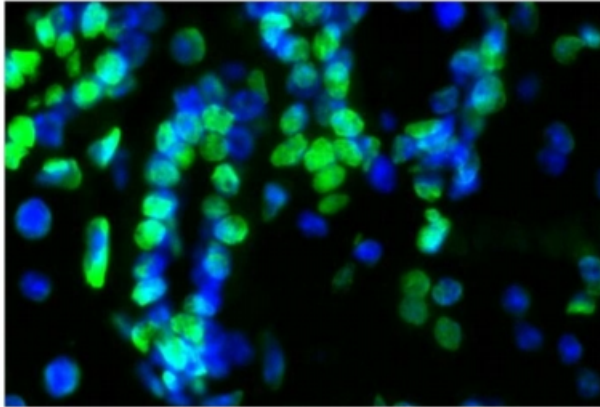
阴性对照体系：准备一份不含 TdT 酶的对照反应混合液，用 dH<sub>2</sub>O 替代 TdT 酶。

- 5.9 细胞在 300×g 离心 10 分钟，去上清并把沉淀重悬在 50 μl TdT 反应混合液中，37°C 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 μL	2 μL	4 μl	5 μl	10 μl
Staining buffer	99 μl	198 μl	396 μ	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™ 647-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，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



老鼠舌组织细胞凋亡检测结果图