



## TUNEL Andy Fluor™ 594 Apoptosis Detection Kit

| 产品货号 | 包装规格 |
|------|------|
| C045 | 50 次 |

储存条件：-20℃ 保存。

激发/发射波长：Andy Fluor 594: 590/615 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™ 594 Apoptosis Detection Kit****货号：C045****试剂盒组分**

| 组分    | 产品名称                       | 包装     | 保存条件  |
|-------|----------------------------|--------|-------|
| C045A | TdT Equilibration buffer   | 9 mL   | -20°C |
| C045B | TdT enzyme                 | 250 µL | -20°C |
| C045C | Labeling 594-dUTP solution | 500 µL | -20°C |
| C045D | DNase I (20U/ µL)          | 13 µL  | -20°C |
| C045E | DNase I buffer             | 700 µL | -20°C |
| C045F | Proteinase K               | 1 mL   | -20°C |
| C045G | 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。

#### 1. 石蜡包埋组织切片

1.1 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%<br>EtOH | 100%<br>EtOH | 95%<br>EtOH | 85%<br>EtOH | 75%<br>EtOH | 1X PBS | 1X PBS |
| 5 min | 5 min | 5 min        | 5 min        | 5 min       | 3 min       | 3 min       | 5 min  | 5 min  |

1.2 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  $\mu$ l 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 |

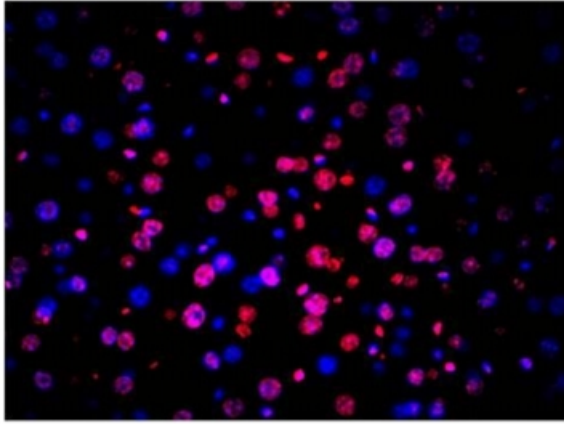
4.8 每个样本中滴加 100  $\mu$ l Andy Fluor™ 594-Streptavidin 染色液，室温孵育 30 分钟， 注意避光。对于组织切片样本，孵育时间可能需要 1 小时。

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。

### 实验案例



老鼠舌组织细胞凋亡检测结果图