TUNEL Andy Fluor™ 647 Apoptosis Detection Kit

产品货号	包装规格
C046	**50** 次

储存条件：-20℃ 保存。
激发/发射波长：Andy Fluor 647: 650/665 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

TUNEL Andy Fluor™ 647 Apoptosis Detection Kit

货号：C046

试剂盒组分

组分	产品名称	包装	保存条件
C046A	TdT Equilibration buffer	9 mL	□-20℃
C046B	TdT enzyme	250 μL	−20 ℃
C046c	Labeling 647-dUTP solution	500 μL	−20 ℃
C046D	DNase IDNase I (20U/ μL)	13 μL	−20 ℃
C046E	DNase I buffer	700 μL	−20 ℃
C046F	Proteinase K	1 mL	−20 ℃
C046G	DAPI Reagent(25μg/mL)	250 μL	−20 ℃

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

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。
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)
用 PBS 洗涤细胞或组织切片，重复一次。
用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 进行通透处理，室温孵育 30 分钟。
用 PBS 洗涤细胞或组织切片，重复一次。

石蜡包埋组织切片
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

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。
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）。
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
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 µ	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 µl 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 3-5×106 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 2×106 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。

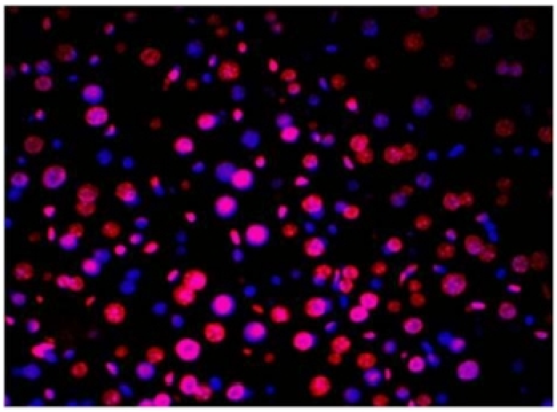
阴性对照体系：准备一份不含 TdT 酶的对照反应混合液，用 dH2O 替代 TdT 酶。

5.9 细胞在 300×g 离心 10 分钟，去上清并把沉淀重悬在 50 μl 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。TUNEL Andy Fluor™ 647 Apoptosis Detection Kit 使用说明书 6 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