

Catalog Number:PF00006

产品介绍:

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 180 bp-200 bp 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 Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 在凋亡细胞断裂 DNA 的 3'-OH 末端催化掺入 CL488-dUTP。CL488-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。

产品内容:

组分	20T	50T
A. TUNEL Equilibration Buffer	2×1 mL	5 mL
B. CL488 TUNEL Reaction Buffer	2×0.5 mL	5×0.5 mL
C. TdT Enzyme	20 μL	50 μL
D. Proteinase K (2 mg/mL)	40 μL	100 μL
E. DNase I (2 U/μL)	5 μL	13 μL
F. 10 × DNase I Buffer	100 μL	260 μL

产品规格:

20T/50T

光谱特性:

CoraLite®488, 简称CL488, 该染料和FITC等染料类似。
Ex/Em: 490/515 nm

储存条件:

-20°C 储存; TUNEL Reaction Buffer 避光储存于-20°C, 避免反复冻融。本产品在推荐条件下可以储存一年。
注: TUNEL Equilibration Buffer 和 TUNEL Reaction Buffer 中含有有毒、致癌成分 Sodium cacodylate trihydrate 和 Cobaltous chloride, 使用时请佩戴口罩、手套, 接触皮肤后, 请立即用大量水冲洗, 废液请按有毒物质处理。

使用方法:

实验材料 (自备)

- 1、PBS 缓冲液(pH~7.4);
- 2、4%多聚甲醛(in PBS);
- 3、牛血清白蛋白(BSA)或正常的羊、牛血清;
- 4、70%乙醇(自选);
- 5、脱蜡溶剂(石蜡切片样本);

实验步骤

一、样本准备:

1. 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 清洗细胞两次。
- 3) 细胞固定: 加入适量 4% 多聚甲醛 (pH 7.4) 溶液, 4°C 放置 30 min。
- 4) PBS 清洗细胞两次。
- 5) 通透细胞: 加入冰上预冷的 70% 乙醇, 在 -20°C 孵育 4 h。细胞能在 70% 乙醇中 -20°C 的条件下保存一周。或者细胞可用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液通透, 室温放置 20 min。
- 6) PBS 清洗细胞两次。

2. 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 5 min, 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 5 min。
- 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 5 min。
- 4) 室温下, 将切片依次浸没于纯水、1×PBS 中各漂洗 1 次, 每次 3 min, 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 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 1 × PBS 稀释, 使其终浓度为 20 μg/mL。每个样本上滴加 100 μL 稀释好的 Proteinase K 溶液, 使溶液覆盖全部样本区域, 室温孵育 20 min。(Proteinase K 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, 所以要优化孵育时间长短。时间一般为 10-30 min, 4 μm 左右的片子可以用 10 min, 30 μm 左右的可用 30 min。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 5 min, 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的标记反应。

For technical support and original validation data for this product please contact:

T: 027-87531629 E: Proteintech-CN@ptglab.com W: ptgcn.com

This product is exclusively available under Proteintech Group brand and is not available to purchase from any other manufacturer.

3. 冰冻组织切片

- 1) 将冰冻切片放置于室温的片架上, 室温 20 min, 晾干。
- 2) 将载玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液 (in PBS) 中, 室温固定 30 min。
- 3) PBS 浸润清洗切片2次, 每次 5 min。
- 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 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 1 × PBS 稀释, 使其终浓度为 20 µg/mL。每个样本上滴加 100 µL 稀释好的 Proteinase K 溶液, 使溶液覆盖全部样本区域, 室温孵育 10 min。Proteinase K 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, 所以要优化孵育时间长短。时间一般为 10-30 min, 4 µm 左右的片子可以用 10 min, 30 µm 左右的可用 30 min, 需摸索最佳时间。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 5 min, 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。

4. 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)

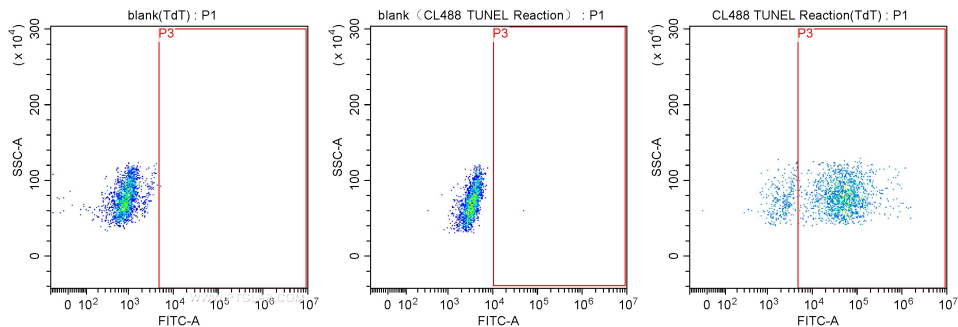
- 1) 按 1:10 的比例用 ddH₂O 将 10 × DNase I Buffer 稀释成 1 × DNase I Buffer 备用。
- 2) 滴加 100 µL 1 × DNase I Buffer 到已通透的样本上, 室温平衡 5 min。
- 3) 用 1 × DNase I Buffer 以 1:100 稀释 DNase I (2 U/µL), 使其为终浓度 20 U/mL 的工作液。
- 4) 轻轻吸掉多余液体, 加入 100 µL 浓度为 20 U/mL DNase I 工作液, 室温孵育 10 min。
- 5) 轻轻吸掉多余液体, PBS 清洗样品 2 次。

二、TUNEL 反应

1. 每个样本加入 100 µL TUNEL 平衡缓冲液, 孵育 5 min。
2. 预先配制 TUNEL 反应混合液: 每个样本需要已加入 1 µL TdT 酶的 50 µL 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 50 µL TUNEL 反应混合液。
 - 1) 贴壁细胞, 用盖玻片使缓冲液均匀覆盖样本。37°C 避光孵育 60 min。
 - 2) 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 15 min 温和的震荡反应管, 使之充分反应。37°C 避光孵育 60 min。
 - 3) 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 2 小时, 湿盒底部铺一张含少量水的纸巾保持湿度。37°C 避光孵育 2 h。
4. 去掉反应液, 在 1 × PBS 的染色缸中浸泡润洗 2 次, 每次 5 min。再使用适量配制于 PBS 中的 0.1% Triton X-100, 其中含 5 mg/mL BSA 的缓冲液清洗样本 3 次, 每次 5 min, 以降低背景。
5. (可选) 复染: 每个样本滴加浓度为 2 µg/mL 的 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min。染色完后, 轻轻去掉染液, 并将样本在 1 × PBS 中浸泡润洗 3 次, 每次 5 min。
6. (可选) 封片: 将切片样本先纯水浸没 5 min, 再依次放入 70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇各浸没 5 min, 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 5 min。(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 µL 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, CL488 是一种绿色荧光染料, 激发波长、发射波长分别为 490 nm, 515 nm (凋亡细胞应被标记上明亮的绿色荧光, 没有加入 TdT 酶的阴性对照样本未被标记上荧光)。

结果展示:

下列实验结果是以培养三天的 Jurkat 细胞进行流式实验, 检测细胞样品中的凋亡细胞的情况:



注意事项:

1. 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。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。