

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。

产品成分

组分	20 T	50 T
CL488 TUNEL Reaction Buffer	1 mL	2 × 1.25 mL
TdT Enzyme	40 uL	100 uL
Proteinase K (2 mg/mL)	40 uL	100 uL
DNase I (2 U/uL)	5 uL	13 uL
10× DNase I Buffer	100 uL	260 uL

20T/50T

包装规格

保存条件

-20℃ 储存；TUNEL Reaction Buffer 避光储存于 -20℃，避免反复冻融。本产品推荐条件下可以储存 2 年。
注：TUNEL；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℃ 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℃ 孵育 4 h。细胞能在 70% 乙醇中 -20℃ 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 1:50 的比例，将 2 mg/ml 的 Proteinase K 溶液用 1× PBS 稀释，使其终浓度为 40 ug/mL。每个样本上滴加 100 uL 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 um 左右的片子可以用 10 min，30 um 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标记反应。

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 1:50 的比例，将 2 mg/ml 的 Proteinase K 溶液用 1× PBS 稀释，使其终浓度为 40 ug/mL。每个样本上滴加 100 uL 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 um 左右的片子可以用 10 min，30 um 左右的可用 30 min。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。
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。

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 uL 1× DNase I Buffer 到已通透的样本上，室温平衡 5 min。

- 3) 用 $1\times$ DNase I Buffer 以 1:100 稀释 DNase I (2 U/ μ L), 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 μ L 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. 预先配制 TUNEL 反应液 (即用即配): 每个样本需要已加入 2 μ L TdT 酶的 50 μ L TUNEL 反应液 (例如 2 μ L TdT 酶加入到 48 μ L TUNEL 反应缓冲液中, 多个样本以此类推)。
2. 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 μ L 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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, 湿盒底部铺一张含少量水的纸巾保持湿度。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h。
3. 去掉反应液, 在 $1\times$ 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。
4. (可选) 复染: 每个样本滴加浓度为 2 μ g/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 $1\times$ PBS 中浸泡润洗 3 次, 每次 5 min。
5. (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 μ 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。
6. 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)。

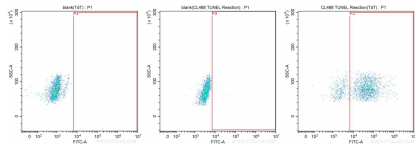
注意

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
2. 染色背景较重或非特异性着色明显时可适当减少染色时间。
3. 实验时建议增加阴性对照和阳性对照组。
4. TUNEL Reaction Buffer 使用时请佩戴口罩、手套, 如接触皮肤, 请立即用大量水冲洗。
5. 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。
6. 本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

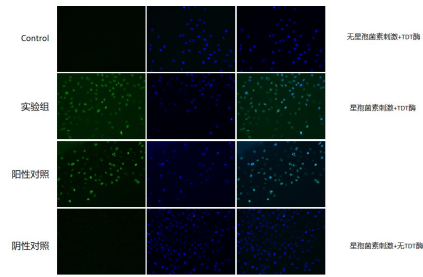
其他

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

Validation Data



上述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



星孢菌素刺激 HeLa细胞4.5 h

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.