

一步法 TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (YF555, 橙红色)

产品编号	产品名称	包装规格
NBS0191-20T	一步法 TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (YF555, 橙红色)	20T
NBS0191-50T	一步法 TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (YF555, 橙红色)	50T

产品简介:

细胞在发生凋亡时, 会激活一些特异性的 DNA 内切酶, 这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA。使得凋亡细胞的 DNA 被切割成 180~200bp 片段, 在琼脂糖凝胶上通常以 180~200bp 的阶梯状迁移。TdT 酶 (脱氧核糖核酸末端转移酶) 将标记的 dUTP 连接到断裂 DNA 暴露的 3'-OH 末端, 通过这些末端添加荧光标记的 dUTP 的方式来标记晚期凋亡细胞, 从而可以通过荧光显微镜或者流式细胞仪进行检测, 这就是 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法的检测细胞凋亡的原理。

本试剂盒应用范围广, 可用于检测冷冻或石蜡切片中的细胞凋亡情况, 也可检测培养的贴壁细胞或悬浮细胞的凋亡情况。可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。本试剂盒检测细胞凋亡, 耗时短, 只需一步染色反应, 洗涤后即可检测。

保存条件:

-20℃避光保存, 2 年有效。

产品组成:

组分	名称	20T	50T
NBS0191-A	555 TUNEL Reaction Buffer	1 mL	2 × 1.25 mL
NBS0191-B	TdT Enzyme	40 μL	100 μL
NBS0191-C	Proteinase K (2 mg/mL)	40 μL	100 μL
NBS0191-D	DNase I (2 U/μL)	5 μL	13 μL
NBS0191-E	10 × DNase I Buffer	100 μL	260 μL

自备材料:

1xPBS 缓冲液 (CAT: #NBS3021); 0.4%Triton X-100; 4%多聚甲醛(CAT: # NBS0135); 免疫组化笔; 脱蜡溶剂 (石蜡切片样本); 石蜡切片处理相关试剂; 抗荧光淬灭封片剂(CAT: #NBS0032); DAPI 染液 (CAT: NBS1206); ddH₂O。

产品使用:

1、样本准备:

(1) 对于贴壁细胞或细胞涂片

- a. PBS 清洗 1 次。注: 如果担心细胞涂片的细胞贴得不牢, 可以干燥样品使细胞贴得更牢。
- b. 固定: 加入适量 4%多聚甲醛 (PBS 配制), 4°C固定 30min。PBS 清洗 2 次。
- c. 通透: 加入适量 0.4%TritonX-100 (PBS 配制), 室温通透 20min。PBS 清洗 2 次。
- d. 转步骤 2.TUNEL 反应。

(2) 对于悬浮细胞或细胞悬液

- a. 收集细胞 ($3-5 \times 10^6$ 个细胞), 1000 rpm 离心 5min, PBS 清洗 2 次。
- b. 固定: 加入适量 4%多聚甲醛 (PBS 配制) 充分重悬细胞, 4°C固定 30min。2000 rpm 离心 5min, PBS 清洗 2 次。
- c. 通透: 加入适量 0.4%TritonX-100 (PBS 配制), 室温通透 20min。2000 rpm 离心 5min, PBS 清洗 2 次。
- d. 转步骤 2.TUNEL 反应。

(3) 石蜡组织切片

- a. 将石蜡切片置于切片架上, 放置于 60°C烘箱中烤片 60min。
- b. 脱蜡与水化: 将切片样本依次放入二甲苯 I (10min) → 二甲苯 II (10min) → 100% 乙醇 I (5min) → 100% 乙醇 II (5min) → 95% 乙醇 (5min) → 90% 乙醇 (5min) → 80%乙醇 (5min) → 70%乙醇 (5min) → ddH₂O 冲洗 5min, 冲洗 2 次。注: 二甲苯有毒, 易挥发, 请在通风橱中进行此操作。
- c. 用滤纸吸干切片样本周围液体, 用免疫组化笔圈好样本轮廓, 以便下游通透与标记。注: 若在后续实验操作中发现免疫组化笔画的轮廓圈被破坏, 需及时补画。
- d. 通透: 按 1:50 的比例, 将 2mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度 40 μ g/mL, 在每个样本上滴加 100 μ L, 使溶液覆盖全部样本区域, 37°C孵育 30min。注: Proteinase K 可通透细胞膜和核膜, 从而使后续步骤的染色试剂充分进入细胞核进行反应, 提高标记效率。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载波片上脱落的风险, 过短则可能造成透性处理不充分, 影响标记效率。为得到更好的结果, Proteinase K 的浓度、孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化。
- e. 将切片样本浸入 1 \times PBS 漂洗三次, 每次 5min, 用滤纸吸去多余的液体, 将处理好的样本放在湿盒中保持湿润。注: 这一步必须把 Proteinase K 洗涤干净, 否则会严重干扰后续的标记反应。
- f. 转步骤 2.TUNEL 反应。

(4) 冰冻组织切片

- a. 固定: 取出冰冻切片, 并回温至室温。将切片样本浸入 4%多聚甲醛 (PBS 配制) 中, 室温固定 30 min。将切片样本浸入 1 \times PBS 漂洗三次, 每次 10min。注: 若是担心甲醛清洗不干净, 影响最终染色效果。可在甲醛固定完成后加入适量 2mg/mL 甘氨酸清洗 10min, 中和残留的固定液, 再进行 PBS 清洗。
- b. 用滤纸吸干切片样本周围液体, 用免疫组化笔圈好样本轮廓, 以便下游通透与标记。注: 若在后续实验操作中发现免疫组化笔画的轮廓圈被破坏, 需及时补画。

c. 通透：按 1:50 的比例，将 2mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度 40 μ g/mL，在每个样本上滴加 100 μ L，使溶液覆盖全部样本区域，37 $^{\circ}$ C 孵育 20min。注：Proteinase K 可通透细胞膜和核膜，从而使后续步骤的染色试剂充分进入细胞核进行反应，提高标记效率。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载波片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到更好的结果，Proteinase K 的浓度、孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化。如优化 Proteinase K 的浓度与孵育时间仍无法改善染色效果，可选择将样本浸入 1%TritonX-100 (PBS 配制) 中，室温促渗 3-5min；之后将切片样本浸入 1 \times PBS 漂洗三次，每次 5min。

d. 将切片样本浸入 1 \times PBS 漂洗三次，每次 5min，用滤纸吸去多余的液体，将处理好的样本放在湿盒中保持湿润。注：这一步必须把 Proteinase K 洗涤干净，否则会严重干扰后续的标记反应。

e. 转步骤 2.TUNEL 反应。

(5) 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)

a. 按 1:10 的比例用 ddH₂O 将 10 \times DNase I Buffer 稀释成 1 \times DNase I Buffer 备用。

b. 滴加 100 μ L 1 \times DNase I Buffer 到已处理的样本上，覆盖全部样本区域，室温平衡 5min。

c. 用 1 \times DNase I Buffer 以 1:100 稀释 DNase I (2U/ μ L)至终浓度 20U/mL 的工作液。

d. 弃去 Buffer，加入 100 μ L 浓度为 20U/mL 的 DNase I 工作液，室温孵育 15min。

e. 弃去 DNase I 工作液，PBS 清洗 2 次。

f. 转步骤 2.TUNEL 反应。

2. TUNEL 反应

(1) 配制 TUNEL 反应液 (即用即配)：

	1 个样本	5 个样本	10 个样本
TdT Enzyme 酶	2 μ L	10 μ L	20 μ L
555 TUNEL Reaction Buffer	48 μ L	240 μ L	480 μ L
TUNEL 反应液总体积	50 μ L	250 μ L	500 μ L

(2) 对于贴壁细胞、细胞涂片或组织切片

a. 每个样本加入 50 μ L TUNEL 反应液，使反应液均匀覆盖样本。37 $^{\circ}$ C 避光孵育适宜的时间 (细胞推荐染色时间 15-30min，组织染色时间推荐 1h)。注：50 μ L TUNEL 反应液适合涂片、切片或 96 孔板 (其他不同孔板可以适当调整 TUNEL 反应液体积，覆盖细胞即可)。如果待检测的样品为涂片、切片或在 24 孔板、12 孔板或 6 孔板中，可以使用防蒸发膜，或自行尝试使用自封袋或者其它适当材料自行裁剪成比孔略小的圆形塑料片，滴加 TUNEL 反应液后覆盖在样品上，可以防止 TUNEL 反应液蒸发，并且使 TUNEL 反应液均匀覆盖样本。

b. 弃去 TUNEL 反应液，PBS 清洗 2 次后，再用 0.1%TritonX-100 (PBS 配制，其中含 5mg/mL BSA) 清洗 3 次，每次 5min，这样游离的未反应的标记物可以清除较干净。

c. (可选) 每个样本加入适量浓度为 5 μ g/mL 的 DAPI 染液，室温避光孵育 5min。染色完成后，弃去 DAPI 染液，PBS 清洗 2 次，每次 5min。

d. (可选) 切片封片：每个样本滴加 20 μ L 抗荧光淬灭封片剂 (抗荧光淬灭封片剂可能会不适用于某些染料，实验前建议进行预实验测试匹配性)，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。

e. 用滤纸吸去多余的液体，向样本区域加 100 μ L PBS 保持样本湿润，立即在荧光显微镜下观察。

(3) 对于悬浮细胞或细胞悬液

a. 每个样本管加入 50 μ L TUNEL 反应液轻轻重悬细胞，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15-30min。每隔 10min 用微量移液器轻轻重悬细胞。

b. 2000 rpm 离心 5min, 弃去 TUNEL 反应液, 用 0.1% TritonX-100 (PBS 配制, 其中含 5mg/mL BSA) 清洗 2 次, 每次 5min, 这样游离的未反应的标记物可以清除较干净。

c. 每个样本管加入 100 μ L 浓度为 5 μ g/mL 的 DAPI 染液, 室温避光孵育 5min。

d. 加入 400 μ L PBS 重悬细胞, 立即用流式细胞仪检测或进行涂片后在荧光显微镜下观察。

注意事项:

1. 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
2. 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
3. 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。
4. 验时建议增加阴性对照和阳性对照组。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品:

产品编号	产品名称	规格
NBS0189-50T	细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	50T
NBS0190-20T	一步法 TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (AF 488, 绿色)	20T
NBS0191-20T	一步法 TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (YF555, 橙红色)	20T
NBS0192-20T	一步法 TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (AF594, 红色)	20T
NBS0193-20T	一步法 TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (YF640, 远红)	20T
NBS0194-20T	Annexin V-Fluor488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒	20T
NBS0195-20T	Annexin V-Fluor647/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒	20T
NBS0196-20T	Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒	20T
NBS0197-20T	Annexin V-APC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒	20T
NBS0198-50T	高效型 Fluor 488-Annexin V/RedNucleus II 细胞凋亡试剂盒 (AF, 绿色, 远红)	50T
NBS0199-50T	高效型 PE-Annexin V/RedNucleus II 细胞凋亡试剂盒 (橙红色, 远红)	50T