

## 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

## 包装规格

20 T/50 T

## 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 ddH<sub>2</sub>O 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/ $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L TdT 酶的 50  $\mu$ L TUNEL 反应液 (例如 2  $\mu$ L TdT 酶加入到 48  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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)。

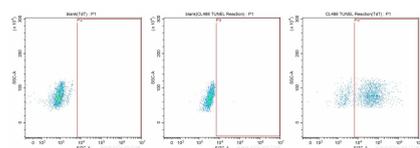
## 注意

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。

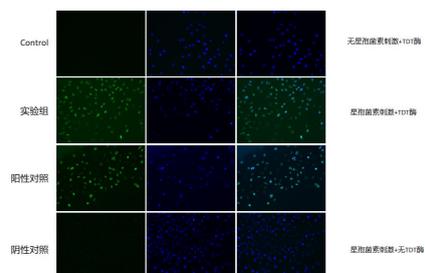
## 其他

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.