

YF[®]594 TUNEL 细胞凋亡试剂盒(红色荧光)

货号: B0014

存储条件: -20°C保存, 组分 A 需避光, 避免反复冻融。

产品组分:

组分	20T	50T
A. YF [®] 594 TUNEL Reaction Buffer	1 mL	2×1.25mL
B. TdT Enzyme	20 μL	50 μL
C. DNase I (2 U/μL)	5 μL	13 μL
D. 10 × DNase I Buffer	100 μL	260 μL

产品介绍

细胞发生凋亡时, 会激活一些 DNA 内切酶, 这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA, 产生 180 bp-200 bp 的 DNA 片段, 表现为琼脂糖凝胶电泳中呈现的梯状 Ladder 图谱。基因组 DNA 双链或单链断裂时会出现产生大量的粘性 3'-OH 末端, 可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的催化作用下, 与 YF[®]-dUTP 结合, 从而通过荧光显微镜或流式细胞仪直接进行凋亡细胞的检测, 这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (Terminal - deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)。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, 很少能够被染色。Tunel 法可以对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色, 能准确地反应细胞凋亡典型的生物化学和形态特征, 可检测出极少量的凋亡细胞, 因而在细胞凋亡的研究中广泛采用。本试剂盒应用范围广, 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。

使用方法**实验材料 (自备)**

PBS 缓冲液 (1x, pH~7.4)

0.2% Triton X-100 (PBS 配制)

0.1% Triton X-100 (PBS 配制, 其中含 5 mg/mL BSA)

4% 多聚甲醛 (PBS 配制)

ddH₂O**实验设计****A. 阳性对照:**

DNase I 处理制备阳性对照。DNase I 可以消化单链或双链 DNA 暴露 3'-OH 末端, 人为造成细胞凋亡。每次实验做一次即可。(用来验证本次实验操作和试剂盒有无问题)

B. 阴性对照:

使用不含 TdT Enzyme 的 TUNEL Reaction Buffer, 用 ddH₂O 替代 TdT Enzyme。(主要是排除细胞自身凋亡、操作过程等原因导致的非特异性染色; 以及调整拍摄曝光强度。)

C. 实验处理组。

实验组按照说明书正常操作。

D. 实验对照组。

实验组按照说明书正常操作。

实验步骤**1. 样本准备:****(1) 对于贴壁细胞**

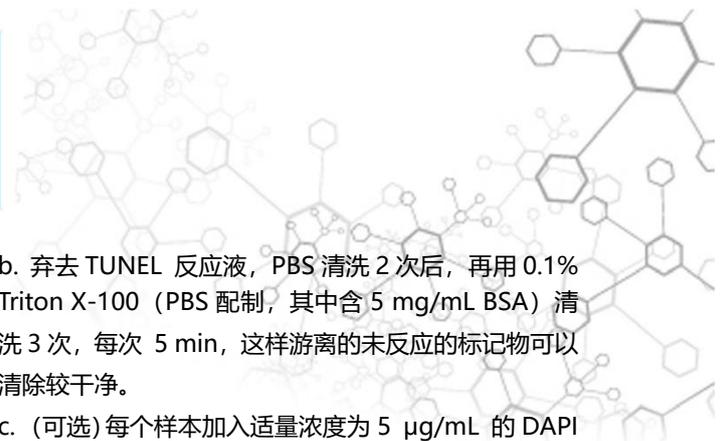
a. PBS 清洗 1 次。

b. 固定: 加入适量 4%多聚甲醛 (PBS 配制), 4°C 固定 30 min。PBS 清洗 2 次。

c. 通透: 加入适量 0.4% Triton X-100 (PBS 配制), 室温通透 20 min。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(3-5×10⁶个细胞), 1000 rpm 离心 5 min, 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 30 min。2000 rpm 离心 5 min，PBS 清洗 2 次。

c. 通透：加入适量 0.4% Triton X-100（PBS 配制），室温通透 20 min。2000 rpm 离心 5 min，PBS 清洗 2 次。

d. 转步骤 2. TUNEL 反应。

(3) 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× DNase I Buffer 稀释成 1× DNase I Buffer 备用。

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

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

d. 弃去 Buffer，加入 100 μL 浓度为 20 U/mL 的 DNase I 工作液，室温孵育 10 min。

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）：

工作液配方	1 个样本	5 个样本	10 个样本
TdT 酶	1 μL	5 μL	10 μL
YF [®] 594 TUNEL Reaction Buffer	49 μL	245 μL	490 μL
TUNEL 反应液总体积	50 μL	250 μL	500 μL

(2) 对于贴壁细胞

a. 每个样本加入 50 μL TUNEL 反应液，使反应液均匀覆盖样本。37°C避光孵育适宜的时间（细胞推荐染色时间 30 min-1 h）。

注：50 μL TUNEL 反应液适合 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% Triton X-100（PBS 配制，其中含 5 mg/mL BSA）清洗 3 次，每次 5 min，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 μg/mL 的 DAPI 染液，室温避光孵育 5 min。染色完成后，弃去 DAPI 染液，PBS 清洗 2 次，每次 5 min。

d. 向样本区域加 100 μL PBS 保持样本湿润，立即在荧光显微镜下观察。YF[®]594 的激发波长为 590nm，发射波长为 617nm。

(3) 对于悬浮细胞或细胞悬液

a. 每个样本管加入 50 μL TUNEL 反应液轻轻重悬细胞，37°C避光孵育 30 min~1 h。每隔 15 min 用微量移液器轻轻重悬细胞。

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

c.（可选）每个样本管加入 100 μL 浓度为 5 μg/mL 的 DAPI 染液，室温避光孵育 5 min。

d. 加入 400 μL 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。YF[®]594 的激发波长为 590nm，发射波长为 617nm。

注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。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。
2. 实验时建议增加阴性对照和阳性对照组。
3. 组分 A 使用时请佩戴口罩、手套，如接触皮肤，请立即用大量水冲洗。
4. 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。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. 本产品只适用于细胞样本染色，若您检测的样本为切片可选择 TUNEL 凋亡检测试剂盒（显色法）（货号：B0068）。

