

TECHNICAL DATA SHEET

Cell Death Detection Kit, 4AF555 TUNEL Assay

Catalog No.	Size
FXP144-050	50 Tests

规格: 50 Tests

储存条件: 本产品应置于-20℃储存; TUNEL Reaction Buffer 避光储存于-20℃, 避免反复冻融。

有效期: 产品在推荐条件下至少可以储存 6 个月。

试剂盒组分:

A.TUNEL Equilibration Buffer	5 mL
B. TUNEL Reaction Buffer	5 × 0.5 mL
C. TdT Enzyme	50 µL

注意: A 和 B 中含有有毒成分使用时请佩戴口罩、手套, 接触皮肤后, 请立即有大量水冲洗, 废液请按有毒物质处理。

描述:

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, 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 4AF555-dUTP。

4AF555-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检测。适用于组织样本 (石蜡切片, 冰冻切片) 或细胞。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。

TUNEL 实验中, TdT 酶催化 dUTP 掺入断裂的 DNA 链的 3' 羟基末端。抗原标记的 dUTP (如地高辛-dUTP、生物素-dUTP) 可以通过孵育二抗 (如抗地高辛抗体或链霉亲和素), 然后进行荧光或比色法检测。而最佳的选择是荧光染料标记的 dUTP, 因为它可以直接进行原位检测, 是一种更快速、直接的检测手段。

实验步骤:

4A Biotech Co., Ltd.

Add: NO. 88, 6th Kechuang St, Biomedical Park, Beijing Economic-Technological Development Area, 101111, China.

Website: www.4abio.com Toll Free (China only): 400-7060-959 Technical support: tech@4abio.com

（一）实验前准备

- 1) PBS 缓冲液 (pH7.4)
- 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)
- 6) 蛋白酶 K (石蜡切片样本)

（二）样本准备

细胞或新鲜冰冻组织切片

- a. 可选：准备一份阴性对照样本（加入不含 TdT 酶的 TUNEL 反应液）
- b. PBS 清洗细胞或组织两次
- c. 细胞固定：加入适量 4%多聚甲醛(pH 7.4)溶液，4℃放置 30min（新鲜冰冻切片不需要此步操作）
- d. PBS 清洗细胞两次
- e. 通透细胞：加入冰上预冷的 70%乙醇，在-20℃ 孵育 4 小时。细胞能在 70%乙醇中-20℃的条件下保存一周。或者，细胞可用配制于 PBS 中的 0.2% Triton X-100 溶液通透，室温放置 30min。
- f. PBS 清洗细胞两次

石蜡组织切片

- a. 可选：准备一份阴性对照样本（加入不含 TdT 酶的 TUNEL 反应液）。
- b. 按照标准方法进行切片脱蜡和水化处理。
- c. PBS 清洗细胞两次。
- d. 用 PBS 稀释的终浓度为 20μg/ml 蛋白酶 K 溶液 100μl 透化组织，37℃放置 30min（蛋白酶 K 的孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化）。
- e. PBS 清洗细胞两次，每次 5min。

（三）TUNEL 反应

- 1) 每个样本加入 100uL TUNEL 平衡缓冲液，孵育 5min。
- 2) 预先配制 TUNEL 反应混合液：每个样本需要已加入 1uL TdT 酶的 50uL TUNEL 反应缓冲液。
- 3) 弃去平衡缓冲液，每个样本加入 50uL TUNEL 反应混合液。
 - a) 贴壁细胞或组织样本，用盖玻片使缓冲液均匀覆盖样本。
 - b) 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 15min 温和的震荡反应管，使之充分反应。
- 4) 37℃避光孵育 60min，组织样本需要 2h。
- 5) 300g 离心，去上清，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。
- 6) 根据需要进行复染。用荧光显微镜或流式细胞仪观察、分析。4AF555 与 Texas Red 染料的光谱类似，激发波长、发射波长分别为 555nm，565nm。（凋亡细胞应被标记上明亮的红色荧光，没有加入 TdT 酶的阴性对照样本未被标记上荧光）。