

# 产品说明书

## YF®488/555/594/Cy3 TUNEL 细胞凋亡试剂盒

产品货号和产品规格:

产品货号	产品名称	产品规格
T6013S	YF®488 TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (绿色荧光)	20T
T6013L		50T
T6039S	YF®555 TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (橙红色荧光)	20T
T6039L		50T
T6014S	YF®594 TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (红色荧光)	20T
T6014L		50T
T6067S	Cy3 TUNEL 细胞凋亡试剂盒	20T
T6067L		50T

产品内容:

组分 \ 规格	20T	50T
A. TUNEL Equilibration Buffer	2×1 mL	5 mL
B. YF®488/555/594/Cy3 TUNEL Reaction Buffer	1 mL	2 × 1.25 mL
C. TdT Enzyme	20 μL	50 μL
D. Proteinase K (2 mg/mL)	40 μL	100 μL
E. DNase I (2 U/μL)	5 μL	13 μL
F. 10 × DNase I Buffer	100 μL	260 μL

### 储存条件

本产品应置于-20℃储存, 组分 B 需避光, 避免反复冻融。有效期见外包装。注: 组分 A 和 B 使用时请佩戴口罩、手套, 接触皮肤, 请立即用大量水冲洗。

### 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, 这种降解非常特异并有规律, 所产生的不同长度的 DNA 片段为 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) 在凋亡细胞中断裂 DNA 的 3'-OH 末端催化掺入 YF®/Cy-dUTP, YF®/Cy-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。标记的 dUTP (如地高辛-dUTP、生物素-dUTP), 可以直接进行原位检测, 是一种更快速、直接的检测手段。

### 使用方法



## 实验材料（自备）

- PBS 缓冲液 (pH~7.4)
- 4%多聚甲醛 (PBS 配制)
- 牛血清白蛋白 (BSA) 或正常的羊、牛血清
- 70%乙醇 (自选)
- 脱蜡溶剂 (石蜡切片样本)

## 实验步骤

### 1. 样本准备:

#### (1) 细胞样品

- 可选: 准备一份阴性对照样本(加入不含 TdT 酶的 TUNEL 反应液)。
- PBS 清洗细胞两次。
- 细胞固定: 加适量 4%多聚甲醛(pH 7.4), 4°C 放置 30 min,
- PBS 清洗细胞两次。
- 通透细胞: 细胞可用配制于 PBS 中的 0.2% Triton X-100 溶液通透, 室温放置 20 min。
- PBS 清洗细胞两次。

#### (2) 石蜡组织切片

- 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。

- 室温下, 将样本浸没于无水乙醇中漂洗 2 次, 每次 5 min。
- 室温下, 将切片样本连续依次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。
- 室温下, 将切片浸没于纯水中漂洗 3 min, 再将切片浸没于 1×PBS 中漂洗 3 min, 用滤纸小心吸干切片样本周围液体。
- 用免疫组化笔描绘样本轮廓, 以便下游通透与标记。
- 按 1: 100 的比例, 将 2 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液用 1×PBS 稀释至终浓度 20 μg/mL, 在每个样本上滴加 100 μL, 使溶液覆盖全部样本区域, 室温孵育 20 min。(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)。

注: 蛋白酶 K 可以帮助渗透组织, 时间短达不到通透效果, 但延长孵育时间可能导致切片脱落。一般情况下, 厚度 4 μm 孵育 10 min, 厚度 30 μm 孵育 30 min。

- 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

- 将冰冻切片放置于室温的片架上, 室温 20 min, 晾干。
  - 将载玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液中, 室温固定 30 min。
  - PBS 浸润清洗切片 2 次, 每次 5 min。
  - 用滤纸小心吸干切片样本周围液体。
  - 按 1: 100 的比例, 将 2 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液用 1×PBS 稀释至终浓度 20 μg/mL, 在每个样本上滴加 100 μL, 使溶液覆盖全部样本区域, 室温孵育 20 min。(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)。
- 注: 蛋白酶 K 可以帮助渗透组织, 时间短达不到通透效果, 但延长孵育时间可能导致切片脱落。一般情况下, 厚度 4 μm 孵育 10 min, 厚度 30 μm 孵育 30 min。
- 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。

(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)

- 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。
- 滴加 100 μL 1× DNase I Buffer 到已通透的样本上, 覆盖全部样本区域, 室温平衡 5 min。
- 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。
- 轻轻吸掉多余液体, 加入 100 μL 浓度为 20 U/mL 的 DNase I 工作液, 室温孵育 10 min。
- 轻轻吸掉多余液体, PBS 清洗样品 2 次。

### 2. TUNEL 反应

(1) 每个样本加入 100 μL TUNEL Equilibration Buffer, 室温孵育 5 min。

(2) 预先配制 TUNEL 反应混合液: 每 50 μL TUNEL Reaction Buffer 中加入 1 μL TdT 酶。

(3) 弃去 TUNEL Equilibration Buffer, 每个样本加入 50 μL



TUNEL 反应混合液。

a. 贴壁细胞，用盖玻片使缓冲液均匀覆盖样本。37°C 避光孵育 60 min。

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 15 min 温和的震荡反应管，使之充分反应。37°C 避光孵育 60 min。

c. 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，37°C 恒温箱孵育 2 h（湿盒底部铺一张含少量水的纸巾保持湿度）。

（4）去掉反应液，在 1×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。

（5）（可选）复染：每个样本滴加浓度为 2 μg/mL 的 DAPI 染液，室温避光孵育 10 min。染色完成后，去掉染液，并将

样本在 1×PBS 中浸泡润洗 3 次，每次 5 min。

（6）（可选）石蜡切片封片：将切片依次在纯水、70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇中浸没 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。脱水完成后，擦去切片周围的液体，每个样本滴加 50 μL 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。

7) 用荧光显微镜或流式细胞仪观察。（凋亡细胞应被标记上明亮的荧光，没有加入 TdT 酶的阴性对照样本不能被标记上荧光）。

## 注意事项

1. 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。

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

