

CoraLite®488 Plus TUNEL凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

Catalog Number: PF00006

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

保存条件

使用方法

20 T/50 T

-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 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。

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的标记反应。

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的标记反应。

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 ddH₂O 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× DNase I Buffer** 以 **1:100** 稀释 **DNase I (2 U/μL)**，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 μL** 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 μL TdT 酶** 的 **50 μL TUNEL** 反应液（例如 **2 μL TdT 酶** 加入到 **48 μL 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 μL 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℃** 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℃** 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℃** 避光孵育 **2 h**。
3. 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。
4. (可选) 复染：每个样本滴加浓度为 **2 μg/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× 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 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。
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）。

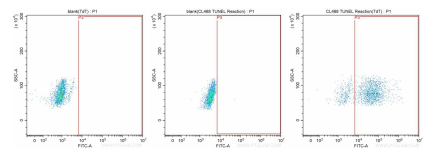
注意

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。

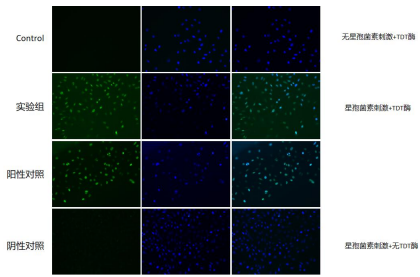
其他

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