

TUNEL 488 Apoptosis Detection Kit {TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, 绿色荧光}

货号: BRK5877

规格: 20 T / 50 T

◆ 产品描述

细胞凋亡时, 细胞内特异性核酸内切酶活化, 染色质 DNA 在核小体间被特异性切割, DNA 降解成 180 - 200 bp 或其整数倍片段。DNA 分子断裂产生的 3'-羟基(3'-OH)末端可以在末端脱氧核糖核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT)的作用下结合荧光素与脱氧尿苷三磷酸核苷酸(dUTP)形成的衍生物, 荧光素-dUTP 标记的断裂 DNA 可以用荧光显微镜直接观察或者用流式细胞仪定量分析, 从而反映细胞凋亡水平。

◆ 产品参数

产品编号	名称	规格 (20 T)	规格 (50 T)	保存条件
BRK5877-1	TdT Enzyme	40 μ L	100 μ L	-25 ~ -15°C
BRK5877-2	5 $\times$ Equilibration Buffer	0.8 mL	2 mL	-25 ~ -15°C
BRK5877-3	Label Mix Green	3 μ L	6.5 μ L	-25 ~ -15°C, 避光
BRK5877-4	Probe Diluent	0.2 mL	0.5 mL	-25 ~ -15°C
BRK5877-5	500 $\times$ DAPI	5 μ L	12 μ L	-25 ~ -15°C, 避光
BRK5877-6	BSA Working Solution	6 mL	15 mL	-25 ~ -15°C
BRK5877-7	TritonX-100 (100%)	100 μ L	100 μ L	2 ~ 8°C
BRK5877-8	DNase I (5 U/ μ L)	4 μ L	10 μ L	-25 ~ -15°C
BRK5877-9	10 $\times$ DNase I Buffer	0.3 mL	0.6 mL	-25 ~ -15°C
BRK5877-10	Proteinase K (20 mg/mL)	4 μ L	10 μ L	-25 ~ -15°C
BRK5877-11	组织自发荧光淬灭剂	2 mL	5 mL	室温, 避光

◆ 保质期

冰袋运输。建议收到产品后保存于-25 ~ -15°C, 有效期 1 年。一旦开封, 请参考说明书中各个组分的最佳保存条件进行储存。

◆ 产品应用

固定后的组织切片或细胞样本的晚期凋亡检测(核膜破裂, DNA 严重片段化)。

◆ 自备实验材料与仪器

4%多聚甲醛, 1 $\times$ PBS, 去离子水, 免疫组化笔, 抗荧光淬灭封片剂, 荧光显微镜, 流式细胞仪。

◆ 注意事项

1. 为确保达到最佳的实验效果，各组分试剂使用前，请先恢复至室温后再使用。
2. 本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及其他非合理用途。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

◆ 实验设计

阳性对照：使用 DNase I 处理样本制备得到阳性对照。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，用来验证本次实验操作和试剂盒有无问题。

阴性对照：使用不含 TdT Enzyme 的标记工作液，而用去离子水替代 TdT Enzyme。主要排除细胞自身凋亡、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。

◆ 实验流程

1. 实验前试剂的准备

- a. Working Label Mix Green:** 使用 Probe Diluent 将 Label Mix Green 稀释 40 倍即可得到 Working Label Mix Green（按需配制），未使用完的 Working Label Mix Green 于 -25 ~ -15°C 避光分装可保存 3 个月，避免反复冻融。
- b. 1 × DAPI:** 使用 PBS 将 500 × DAPI 稀释成 1 × DAPI（按需配制）。
- c. 0.3% TritonX-100:** 使用 PBS 将 100% TritonX-100 稀释成 0.3% TritonX-100（用于细胞样本的通透）。
- d. 1 × Equilibration Buffer:** 使用去离子水将 5 × Equilibration Buffer 稀释成 1 × Equilibration Buffer（按需配制）。
- e. 1 × DNase I Buffer:** 使用去离子水将 10 × DNase I Buffer 稀释成 1 × DNase I Buffer（按需配制）。
- f. 组织自发荧光淬灭剂:** 为即用型试剂，能够显著淬灭组织自发荧光的现象，无组织自发荧光现象则无需使用，使用完后拧紧瓶盖防止试剂挥发。

2. 实验步骤

2.1 组织切片

1) 石蜡切片

脱蜡、水化及通透：

- a. 依次将切片放入二甲苯I 15min、二甲苯II 15min、无水乙醇I 5min、无水乙醇II 5min、95% 乙醇 5min、85%乙醇 5min、75%乙醇 5min，蒸馏水 5min。
- b. 用 1 × PBS 浸泡润洗切片，切片稍甩干后，使用免疫组化笔在样品组织周围描绘样品分布的轮廓，便于下游通透性处理和平衡标记操作。在实验过程中，切勿让样品干燥。处理好的样本需放在湿盒中保持湿润。

c. 使用 PBS 按 1:1000 的稀释比例稀释 Proteinase K (20 mg/mL) 母液，制备成 20 $\mu\text{g/mL}$ Proteinase K 工作液。滴加 100 μl 的 Proteinase K 工作液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 10 min。

▲①Proteinase K 工作液需现配现用，使用前请先恢复至室温；②必须针对特定组织类型和切片厚度优化蛋白酶 K 的消化时间。蛋白酶 K 过度消化将导致细胞结构丧失，组织切片可能会从玻片上脱落。消化不充分会导致 TdT 标记不充分。

d. 使用 PBS 溶液浸泡润洗样本 2-3 次，每次 3-5 min 来终止 Proteinase K 的消化作用。

e. 滴加 100 μl 的 PBS 溶液，使溶液覆盖全部样本区域，以维持样本湿润。在荧光显微镜 488 的通道下，观察样本是否存在组织自发荧光的现象（尤其是血红蛋白比较多的组织样本）。如果存在较为明显的组织自发荧光的现象，则需要在 DAPI 复染后，封片前，使用组织自发荧光淬灭剂进行处理。如果无组织自发荧光的现象，则无需处理。

阳性对照组（必做）：

样本通透处理之后，可通过 DNase I 处理样本来准备阳性对照。

a. 使用 1 $\times$ DNase I Buffer 按 1:500 的稀释比例将 5 U/ μL 的 DNase I 稀释成 10 U/mL 的 DNase I 工作液。滴加 100 μl 的 DNase I 工作液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 20 min。

b. 轻轻吸掉多余液体，使用 PBS 溶液浸泡润洗样本 3 次，每次 5 min。

▲阳性对照样本须使用单独的染色洗涤缸，防止样本上残余的 DNase I 可能会在实验组中造成假阳性的错误信号。

标记及检测：

a. 滴加 100 μl 1 $\times$ Equilibration Buffer 使其全部覆盖待检样本区域，室温平衡 10 min。

b. 平衡期间按照下表配制标记工作液。

组分	阴性对照组	阳性对照组/实验组
去离子水	35 μl	33 μl
5 $\times$ Equilibration Buffer	10 μl	10 μl
Working Label Mix Green	5 μl	5 μl
TdT Enzyme	0 μl	2 μl
总体积	50 μl	50 μl

▲①配置标记工作液之前，请先将各组分完全平衡至室温；②5 $\times$ Equilibration Buffer 母液因低温保存，会出现少量成分析出的现象，请混匀后再使用；③对于组织面积小于 5 cm^2 的切片样本，每个样本所需标记工作液的体积是 50 μl 。但对于组织面积较大的切片样本，可成比例地增加试剂的体积，以均匀覆盖组织为宜。

c. 平衡结束后，除去 1 $\times$ Equilibration Buffer。滴加 50 μl 的标记工作液，并在湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h。

▲湿盒底部需要加入适量超纯水以在孵育过程中保持湿润，从而尽量减少标记工作液的蒸发。

d. 反应结束后，除去标记工作液，用 PBS 溶液洗涤 2 次，每次 5 min。

e. 滴加 100 μ l 的 1 $\times$ DAPI，室温避光孵育 10 min。

f. 除去 DAPI 染色液，用 PBS 溶液洗涤 3 次，每次 5 min。

g. 组织自发荧光淬灭（可选）：（1）滴加 100 μ l 的组织自发荧光淬灭剂，使溶液覆盖全部样本区域，室温避光孵育 5 min。在孵育过程中，需要及时补添组织自发荧光淬灭剂，以免试剂变干凝固结块，影响后续拍照观察。（2）淬灭处理结束后，使用去离子水浸洗 5 min 后，用 PBS 浸洗 3 次，每次 5 min。

▲①需精确组织自发荧光淬灭剂的孵育时间，可在第一个样本添加淬灭剂后开始计时 5 min；②组织自发荧光淬灭剂处理后组织会被染成浅蓝色，但不影响荧光显微镜最终的成像效果；③组织自发荧光淬灭剂易挥发，在孵育过程中，需要及时补添淬灭剂，以免试剂变干凝固结块，影响后续拍照观察；④无组织自发荧光的切片样本可省略此步骤。

h. 切片稍甩干后，用抗荧光淬灭封片剂封片，尽量避免产生气泡。

i. 立即在荧光显微镜下检测样本：Label Mix Green 的最大激发波长是 490 nm，最大发射波长为 520 nm，和 AlexaFluor 488，DyLight 488，FAM，Cy2 的检测通道比较接近。因此，可以选取相对应的检测条件进行荧光图像的采集。

2) 冰冻切片

切片复温、固定及通透：

a. 将冰冻切片置于片架上，室温静置复温 10 min。

b. 使用免疫组化笔在样品组织周围描绘样品分布的轮廓，便于下游的固定、通透性和平衡标记操作。滴加 100 μ l 的 4%多聚甲醛固定液，使溶液覆盖全部样本区域，室温固定 30 min。

c. 除去固定液，使用 PBS 溶液浸泡润洗样本 2 次，每次 5 min。

d. 使用 PBS 按 1:1000 的稀释比例稀释 Proteinase K (20 mg/mL)母液，制备成 20 μ g/mL Proteinase K 工作液。滴加 100 μ l 的 Proteinase K 工作液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 10 min。

▲①Proteinase K 工作液需现配现用，使用前请先恢复至室温；②必须针对特定组织类型和切片厚度优化蛋白酶 K 的消化时间。蛋白酶 K 过度消化将导致细胞结构丧失，组织切片可能会从玻片上脱落。消化不充分会导致 TdT 标记不充分。

e. 使用 PBS 溶液浸泡润洗样本 2-3 次，每次 3-5 min 来终止 Proteinase K 的消化作用。

f. 滴加 100 μ l 的 PBS 溶液，使溶液覆盖全部样本区域，以维持样本湿润。在荧光显微镜 488 的通道下，观察样本是否存在组织自发荧光的现象（尤其是血红蛋白比较多的组织样本）。如果存在较为明显的组织自发荧光的现象，则需要在 DAPI 复染后，封片前，使用组织自发荧光淬灭剂进行处理。如果无组织自发荧光的现象，则无需处理。

阳性对照组（必做）：

样本通透处理之后，可通过 DNase I 处理样本用来准备阳性对照。

a. 使用 $1 \times$ DNase I Buffer 按 1:500 的稀释比例将 $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ 的 DNase I 稀释成 $10 \text{ U}/\text{mL}$ 的 DNase I 工作液。

滴加 $100 \mu\text{L}$ 的 DNase I 工作液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 20 min。

b. 轻轻吸掉多余液体，使用 PBS 溶液浸泡润洗样本 3 次，每次 5 min。

▲阳性对照样本须使用单独的染色洗涤缸，防止样本上残余的 DNase I 可能会在实验组中造成假阳性的错误信号。

标记及检测：

a. 滴加 $100 \mu\text{L}$ $1 \times$ Equilibration Buffer 使其全部覆盖待检样本区域，室温平衡 10 min。

b. 平衡期间按照下表配制标记工作液。

组分	阴性对照组	阳性对照组/实验组
去离子水	$35 \mu\text{L}$	$33 \mu\text{L}$
$5 \times$ Equilibration Buffer	$10 \mu\text{L}$	$10 \mu\text{L}$
Working Label Mix Green	$5 \mu\text{L}$	$5 \mu\text{L}$
TdT Enzyme	$0 \mu\text{L}$	$2 \mu\text{L}$
总体积	$50 \mu\text{L}$	$50 \mu\text{L}$

▲①配置标记工作液之前，请先将各组分完全平衡至室温；② $5 \times$ Equilibration Buffer 母液因低温保存，会出现少量析出的现象，请混匀后再使用；③对于组织面积小于 5 cm^2 的切片样本，每个样本所需标记工作液的体积是 $50 \mu\text{L}$ 。但对于组织面积较大的切片样本，可成比例地增加试剂的体积，以均匀覆盖组织为宜。

c. 平衡结束后，除去 $1 \times$ Equilibration Buffer。滴加 $50 \mu\text{L}$ 的标记工作液，并在湿盒中 37°C 避光孵育 1 h。

▲湿盒底部需要加入适量超纯水以在孵育过程中保持湿润，从而尽量减少标记工作液的蒸发。

d. 反应结束后，除去标记工作液，用 PBS 溶液洗涤 2 次，每次 5 min。

e. 滴加 $100 \mu\text{L}$ 的 $1 \times$ DAPI，室温避光孵育 10 min。

f. 除去 DAPI 染色液，用 PBS 溶液洗涤 3 次，每次 5 min。

g. 组织自发荧光淬灭（可选）：（1）滴加 $100 \mu\text{L}$ 的组织自发荧光淬灭剂，使溶液覆盖全部样本区域，室温避光孵育 5 min。在孵育过程中，需要及时补添组织自发荧光淬灭剂，以免试剂变干凝固结块，影响后续拍照观察。（2）淬灭处理结束后，使用去离子水浸洗 5 min 后，用 PBS 浸洗 3 次，每次 5 min。

▲①需精确组织自发荧光淬灭剂的孵育时间，可在第一个样本添加淬灭剂后开始计时 5 min；②组织自发荧光淬灭剂处理后组织会被染成浅蓝色，但不影响荧光显微镜最终的成像效果；③组织自发荧光淬灭剂易挥发，在孵育过程中，需要及时补添淬灭剂，以免试剂变干凝固结块，影响后续拍照观察；④无组织自发荧光的样本可省略此步骤。

- h. 切片稍甩干后，用抗荧光淬灭封片剂封片，尽量避免产生气泡。
- i. 立即在荧光显微镜下检测样本：Label Mix Green 的最大激发波长是 490 nm，最大发射波长为 520 nm，和 AlexaFluor 488，DyLight 488，FAM，Cy2 的检测通道比较接近。因此，可以选取相对应的检测条件进行荧光图像的采集。

2.2 细胞样本

1) 贴壁细胞（以 96 孔板，荧光成像为例）

样本处理：

- 细胞样本的准备：在 TC 处理或多聚赖氨酸包被的 96 孔细胞培养板上培养贴壁细胞。在凋亡诱导处理之后，进行后续实验。同时，培养无诱导的对照组细胞。
 - 吸弃培养基，每孔加入 100 μ l PBS，轻柔洗涤细胞 1 次。
 - 吸弃 PBS，每孔加入 100 μ l 的 4%多聚甲醛固定液，室温静置固定 20 min。
 - 吸弃固定液，每孔加入 100 μ l 的 PBS，轻柔洗涤细胞 2 次。
 - 吸弃 PBS，每孔加入 100 μ l 的 0.3%TritonX-100 溶液，室温静置通透 10 min。
- ▲细胞样本在处理时较易脱落，建议使用 0.3%的 Triton X-100 溶液进行通透，以避免因过度通透引起细胞的脱落。
- 吸弃通透液，每孔加入 100 μ l BSA Working Solution 轻柔洗涤细胞 2 次。

阳性对照组（必做）：

样本通透处理之后，可通过 DNase I 处理样本用来准备阳性对照。

- 使用 1 $\times$ DNase I Buffer 按 1:500 的稀释比例将 5 U/ μ l 的 DNase I 稀释成 10 U/mL 的 DNase I 工作液。每孔滴加 100 μ l 的 DNase I 工作液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 20 min。
- 轻轻吸掉多余液体，每孔加入 100 μ l PBS 溶液轻柔洗涤细胞 3 次。

标记及检测：

- 每孔滴加 100 μ l 1 $\times$ Equilibration Buffer 使其全部覆盖待检样本区域，室温平衡 10 min。
- 平衡期间按照下表配制标记工作液。

组分	阴性对照组	阳性对照组/实验组
去离子水	35 μ l	33 μ l
5 $\times$ Equilibration Buffer	10 μ l	10 μ l
Working Label Mix Green	5 μ l	5 μ l
TdT Enzyme	0 μ l	2 μ l
总体积	50 μ l	50 μ l

▲①配置标记工作液之前，请先将各组分完全平衡至室温；②5 × Equilibration Buffer 母液因低温保存，会出现少量成分析出的现象，请混匀后再使用；③对于 96 孔板，每个孔样本所需标记工作液的推荐体积是 50 μ l。但需依据样本特性及面积大小适当调整加入标记工作液的体积，以均匀淹没细胞样本为宜。

- c. 平衡结束后，吸弃 1 × Equilibration Buffer。每孔滴加 50 μ l 的标记工作液，盖上 96 孔板外盖，37°C 避光孵育 1 h。
- d. 反应结束后，吸弃标记工作液，每孔加入 100 μ l PBS 溶液轻柔洗涤细胞 2 次，每次 5 min。
- e. 吸弃 PBS，每孔加入 100 μ l 的 1 × DAPI，室温避光孵育 10 min。
- f. 吸弃 DAPI 染色液，每孔加入 100 μ l PBS 溶液轻柔洗涤细胞 3 次，每次 5 min。
- g. 立即在荧光显微镜下检测样本：Label Mix Green 的最大激发波长是 490 nm，最大发射波长为 520 nm，和 AlexaFluor 488，DyLight 488，FAM，Cy2 的检测通道比较接近。因此，可以选取相对应的检测条件进行荧光图像的采集。

2) 悬浮细胞（以流式检测为例）

样本处理：

- a. 细胞样本的准备：悬浮细胞在凋亡诱导处理之后，进行后续实验。同时，培养无诱导的对照组细胞。
- b. 将 $2-3 \times 10^6$ 个细胞用 PBS 轻柔洗涤 2 次。4°C、1800 rpm 离心 5 min，弃上清。
- c. 加入 1 ml 的 4%多聚甲醛固定液，室温静止固定 20 min。4°C、1800 rpm 离心 5 min，弃上清。
- d. 加入 1 ml 的 PBS，轻柔洗涤细胞 2 次。4°C、1800 rpm 离心 5 min，弃上清。
- e. 加入 1 ml 的 0.3%TritonX-100 溶液，室温静置通透 10 min。4°C、1800 rpm 离心 5 min，弃上清。

▲通透后的细胞折光率会下降，细胞透明不易观察，操作过程中应小心操作，避免细胞样本丢失。

- f. 加入 500 μ l 的 BSA Working Solution 轻柔洗涤细胞 2 次。

阳性对照组（必做）：

样本通透处理之后，可通过 DNase I 处理样本用来准备阳性对照。

- a. 使用 1 × DNase I Buffer 按 1:500 的稀释比例将 5 U/ μ l 的 DNase I 稀释成 10 U/mL 的 DNase I 工作液。加入 200 μ l 的 DNase I 工作液，室温孵育 20 min。4°C、1800 rpm 离心 5 min，弃上清。
- b. 加入 1 ml 的 PBS 溶液轻柔洗涤细胞 3 次。

标记及检测：

- a. 加入 200 μ l 1 × Equilibration Buffer，室温平衡 10 min。
- b. 平衡期间按照下表配制标记工作液。

组分	阴性对照组	阳性对照组/实验组
去离子水	35 μ l	33 μ l
5 × Equilibration Buffer	10 μ l	10 μ l
Working Label Mix Green	5 μ l	5 μ l
TdT Enzyme	0 μ l	2 μ l
总体积	50 μ l	50 μ l

▲①配置标记工作液之前，请先将各组分完全平衡至室温；②5 × Equilibration Buffer 母液因低温保存，会出现少量成分析出的现象，请混匀后再使用；③对于 2×10^6 个细胞的一个标准反应，所需体积是 50 μ l。用 50 μ l 乘以上反应数目来确定所需标记工作液的总体积。

c. 平衡结束后，4°C、1800 rpm 离心 5 min，弃上清。加入 50 μ l 的标记工作液，37°C 避光孵育 1 h。

d. 4°C、1800 rpm 离心 5 min，加入 1 ml 的 PBS 溶液轻柔洗涤细胞 2 次，每次 5 min。

e. 立即用流式细胞仪检测：Label Mix Green 的最大激发波长是 490 nm，最大发射波长为 520 nm，使用流式细胞仪选择 FITC 通过即可检测。