

TUNEL Apoptosis Detection Kit (YSFluor™ 488)**TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (YSFluor™ 488)****产品信息**

产品名称	产品编号	规格
TUNEL Apoptosis Detection Kit (YSFluor™ 488)	40307ES20	20 T
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (YSFluor™ 488)	40307ES50	50 T
	40307ES60	100 T

产品描述

细胞在发生凋亡时，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。细胞凋亡时抽提 DNA 进行电泳检测，可以发现 180-200bp 的 DNA ladder。

TUNEL (TdT mediated dUTP Nick End Labeling) 细胞凋亡检测试剂盒 (YSFluor™ 488) 可以用来检测组织细胞在凋亡晚期过程中细胞核 DNA 的断裂情况。其原理是在末端脱氧核糖核苷酸转移酶 (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 的作用下，在基因组 DNA 断裂时暴露出的 3'-羟基 (3'-OH) 末端掺入 YSFluor™ 488-12-dUTP，从而可以用荧光显微镜或流式细胞仪检测。

YSFluor™ 488 染料稳定性更高，信号更强，从而使标记物更亮，抗淬灭能力更强。

本试剂盒应用范围广，可用于检测冷冻或石蜡切片中的细胞凋亡情况，也可检测培养的贴壁细胞或悬浮细胞的凋亡情况。

产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格		
		40307ES20 (20 T)	40307ES50 (50 T)	40307ES60 (100 T)
40307-A	5×Equilibration Buffer	750 µL	1.25 mL×2	1.25 mL×3
40307-B	YSFluor™ 488-12-dUTP Labeling Mix	100 µL	250 µL	250 µL×2
40307-C	Recombinant TdT Enzyme	20 µL	50 µL	50 µL×2
40307-D	Proteinase K(2 mg/mL)	40 µL	100 µL	100 µL×2
40307-E	DNase I (1 U/µL)	5 µL	12.5 µL	25 µL
40307-F	10 × DNase I Buffer with MgCl ₂	100 µL	250 µL	500 µL

运输与保存方法

冰袋 (wet ice) 运输。

本试剂盒储存在 -20°C，YSFluor™ 488-12-dUTP Labeling Mix 避光储存于 -20°C，有效期为 1 年。

注意事项

- 1、需自备用于洗涤细胞的 PBS，用于封片的抗荧光淬灭封片液，用于固定的 4%多聚甲醛。
- 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 3、本产品仅作科研用途！

操作步骤**一、样品准备****1.1 石蜡包埋组织切片**

- 1.1.1 室温下将石蜡组织切片放入二甲苯中浸泡 5 min，重复一次，以彻底脱掉石蜡。

1.1.2 室温下用 100%乙醇浸泡切片 5 min，重复一次。

1.1.3 室温下用梯度乙醇（90、80、70%）各浸洗 1 次，每次 3 min。

1.1.4 用 PBS 轻轻润洗切片，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余液体。此时可用石蜡笔或疏水笔在样品周围描绘样品分布的轮廓，便于下游透性处理和平衡标记操作。在实验过程中切勿让样品干燥，处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

1.1.5 按 1:100 的比例，用 PBS 作为稀释液来稀释 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液，使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.6 每个样本上滴加 100 μL 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Proteinase K 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 20 min。

【注】：Proteinase K 帮助组织和细胞对后续步骤的染色试剂通透。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载玻片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到更好的结果，可能需要优化 Proteinase K 孵育的时间。

1.1.7 PBS 溶液润洗样本 2-3 次，轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理后的样本放在湿盒中保持样本湿润。

1.2 组织冰冻切片

1.2.1 取出冰冻切片，并回温至室温。将玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液（溶于 PBS）中固定，室温下孵育 30 min。

1.2.2 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体。

1.2.3 将玻片浸没在 PBS 溶液中，室温孵育 15 min，重复 PBS 洗一次，共 2 次。

1.2.4 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余液体。此时可用石蜡笔或疏水笔在样品周围描绘样品分布的轮廓，便于下游透性处理和平衡标记操作。在实验过程中，切勿让样品干燥，处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

1.2.5 按 1:100 的比例，用 PBS 作为稀释液来稀释 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液，使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.6 每个样本上滴加 100 μL 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Proteinase K 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 10 min。**【注】**：Proteinase K 帮助组织和细胞对后续步骤的染色试剂通透。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载玻片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。未得到更好的结果，可能需要优化 Proteinase K 孵育的时间。

1.2.7 在盛有 PBS 溶液的敞口烧杯中润洗样本 2-3 次。

【注】：为了避免在清洗步骤中的样本脱片损失，建议不用洗瓶清洗，而是将玻片浸在 PBS 溶液中 2-3 次进行清洗。

1.2.8 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理后的样本放在湿盒中保存样本的湿润。

1.3 细胞爬片的准备

在 Lab-Tek 载玻片小室（Chamber Slides）上培养贴壁细胞。在凋亡诱导处理之后，用 PBS 洗 2 遍载玻片。

1.4 细胞涂片的制备（以多聚赖氨酸包被的载玻片为例）

1.4.1 以约 2×10^7 个细胞/mL 的浓度将细胞重悬于 PBS 中，吸取 50-100 μL 细胞悬液滴于多聚赖氨酸包被的载玻片上，用一片干净的载玻片轻柔的涂开细胞悬液。

1.4.2 固定细胞，将载玻片浸入装有 4%新鲜配制于 PBS 中的多聚甲醛的染色缸中，在 4°C 放置 25 min。

1.4.3 洗涤载玻片，将其浸入 PBS 中，室温放置 5 min。重复用 PBS 洗一次。

1.4.4 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余液体。这时可用石蜡笔或疏水笔在样品周围描绘样品分布的轮廓，便于下游透性处理和平衡标记操作。在实验过程中，切勿让样品干燥，处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

1.4.5 按 1:100 的比例，用 PBS 作为稀释液来稀释 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液，使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.4.6 每个样本上滴加 100 μL 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Proteinase K 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 5 min（也可浸于 0.2%配制于 PBS 中的 Triton X-100 溶液中，室温孵育 5 min 进行通透处理）。**【注】**：Proteinase K 帮助组织和细胞对后续步骤的染色试剂通透。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载玻片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。未得到更好的结果，可能需要优化 Proteinase K 孵育的时间。

1.4.7 PBS 润洗样本 2-3 次，轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理后的样本放在湿盒中。

二、DNA 酶处理阳性对照的步骤

在样本通透处理后，用 DNA 酶 I 处理细胞来准备阳性对照载玻片。该流程通常会引起被处理的大多数细胞显现绿色荧光。

【注】：DNA 酶 I 处理固定的细胞会引起染色体 DNA 的断裂，产生许多可标记的 DNA 3'-末端。

2.1 按 1:10 的比例用去离子水稀释 10 \times DNase I Buffer(每个样本需用 200 μL 1 \times DNase I Buffer，即需要用 20 μL 10 \times DNase I Buffer 和 180 μL 去离子水混合稀释)，取其中 100 μL 滴加到已通透的样本上，室温孵育 5min。向剩余 100 μL 1 \times DNase I Buffer 中加 1 μL DNase I (1U/ μL)，使其终浓度为 10 U/mL。

2.2 轻轻叩掉液体，加入 100 μL 含 10 U/mL DNase I 的缓冲液，室温孵育 10 min。

2.3 轻叩载玻片，去掉多余的液体，并将载玻片在装有去离子水的染色缸中彻底洗 3-4 次。

【注】：阳性对照载玻片必须使用单独的染色缸，否则阳性对照载玻片上残余的 DNase I 可能会在实验载玻片上引入高背景。

三、标记与检测

3.1 按 1:5 的比例用去离子水稀释适量 5×Equilibration Buffer（每个样品需要 100 μL 1×Equilibration Buffer）。

3.2 每个样本滴加 100 μL 1×Equilibration Buffer 使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 10-30 min。或者将载玻片放入一个含有 1×Equilibration Buffer 的缸中，保证缓冲液没过样本。在平衡细胞的同时在冰上解冻 YSFluor™ 488-12-dUTP Labeling Mix，并依照表 1，准备足够量的用于所有实验的和可选阳性对照反应的 TdT 孵育缓冲液。对于面积小于 5 cm² 的一个标准反应，其体积是 50 μL，用 50 μL 乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需 TdT 孵育缓冲液的总体积。对于表面积更大的样本，可成比例的增大试剂体积。

表 1 准备用于实验的和可选阳性对照反应的 TdT 孵育缓冲液

组分	体积 (μL/50 μL 体系)
ddH ₂ O	34
5×Equilibration Buffer	10
YSFluor™ 488-12-dUTP Labeling Mix	5
Recombinant TdT Enzyme	1

【阴性对照体系】：准备一份不含 TdT 酶的对照孵育缓冲液，用 ddH₂O 替代 TdT 酶。

3.3 在平衡后的区域周围用吸水纸洗掉 100 μL 1×Equilibration Buffer 中的大部分，然后在 5 cm² 面积的细胞上加入 50 μL TdT 孵育缓冲液。不要让细胞干掉。**这之后的操作，载玻片要避光。**

3.4 把塑料盖玻片盖在细胞上以保证试剂的平均分布，在湿盒的底部放上用水浸湿的纸巾。将载玻片置于湿盒内，在 37°C 孵育 60 min。将湿盒用铝箔纸包裹以避光。

【注】：塑料盖玻片在使用前可以切成两半。折起盖玻片的边缘以便于移除和操作。

3.5 移除塑料盖玻片，并将切片置于 PBS 溶液中室温孵育 5 min，换用新鲜 PBS 再重复清洗 2 次。

3.6 用滤纸轻轻擦掉样本周围及背面的 PBS 溶液。

【注】：为了降低背景，载玻片在用 PBS 洗一遍后，可再用含 0.1% Triton X-100 和 5 mg/mL BSA 的 PBS 洗 3 次，每次 5 min，这样游离的未反应的标记物可以清楚较干净。

3.7 样本在染色缸中染色，在黑暗中将载玻片浸入装有 PI 溶液（1 μg/mL，用 PBS 新鲜配制并稀释）的染色缸，室温放置 5 min。（可选）：样本在染色缸中染色，在黑暗中将载玻片浸入装有 DAPI 溶液（2 μg/mL，用 PBS 新鲜配制并稀释）的染色缸，室温放置 5 min。

3.8 洗涤样本，将载玻片浸入去离子水中，室温放置 5 分钟。重复两次，总共洗三次。

3.9 叩干载玻片上多余的水并向样本区域加 100 μL PBS 保持样本湿润。

3.10 立即在荧光显微镜下分析样本，用标准的荧光过滤装置在 520±20 nm 的荧光下观察绿色荧光；在 >620 nm 下观察 PI 的红色荧光，或在 460 nm 观察蓝色的 DAPI。如有必要，载玻片能在 4°C 黑暗条件下存放过夜。【注】：PI/DAPI 能将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色/蓝色，只在凋亡的细胞核中才有 YSFluor™ 488-12-dUTP 掺入而定位的绿色荧光。

四、利用流式细胞术检测悬浮细胞

4.1 将 3-5×10⁶ 个细胞用 PBS 在 4°C 离心（300×g）洗两次，4°C 300 g 离心 10 min，然后重悬在 0.5 mL PBS 中。

4.2 固定细胞，加入 5 mL 1% 配制于 PBS 中的多聚甲醛溶液，冰上放置 20 min。

4.3 细胞在 4°C 300×g 离心 10 min，去上清并且重悬于 5 mL PBS。重复洗一次，并用 0.5 mL PBS 重悬细胞。

4.4 通透细胞，加入 5 mL 冰上预冷的 70% 乙醇，在 -20°C 孵育 4 小时。细胞能在 70% 乙醇中 -20°C 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 5 min。

4.5 细胞在 300×g 离心 10 min，并用 5 mL PBS 重悬。重复离心，并 1 mL PBS 重悬。

4.6 转移 2×10⁶ 个细胞至一个 1.5 mL 的微量离心管。

4.7 300×g 离心 10 min，去上清，并用 80 μL 1×Equilibration Buffer 重悬。室温孵育 5 min。

4.8 在平衡细胞的同时，在冰上融解 YSFluor™ 488-12-dUTP Labeling Mix，并依照表 1，准备足够量用于所有反应的 TdT 孵育缓冲液。对于 2×10⁶ 个细胞的一个标准反应，其体积是 50 μL，50 μL 乘上反应数目即所需 TdT 孵育缓冲液的总体积。

4.9 细胞在 300×g 离心 10 min，去上清并把沉淀重悬在 50 μL TdT 孵育缓冲液中，37°C 孵育 60 min，避光。每隔 15 min 用微量移液器轻轻重悬细胞。

4.10 加入 1 mL 20 mM EDTA 终止反应，用微量移液器轻柔混匀。

4.11 300g 离心 10 min，弃上清并把沉淀重悬在 1 mL 配制于 PBS 中的 0.1% Triton X-100 溶液，其中含 5 mg/mL BSA，重复一次，总共洗 2 次。

4.12 300 g 离心 10 min 弃上清，细胞重悬于 0.5 mL 用 PBS 新配制的 5 μ g/mL PI 溶液中，其中包含 250 μ g 无 DNA 酶的 RNA 酶 A。

4.13 在黑暗中室温孵育细胞 30 min。

4.14 用流式细胞仪分析细胞，在 520 \pm 20 nm 的荧光下观察绿色荧光；在 $>$ 620 nm 下观察 PI 的红色荧光。PI 能将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色，只在凋亡的细胞核中才有 YSFluor™ 488-12-dUTP 掺入而定位的绿色荧光。