



## One-step TUNEL Flow Cytometry Apoptosis Kit (Green, AF488) 一步法 TUNEL 原位细胞凋亡流式检测试剂盒 (绿色, AF488)

### 产品信息

品名	货号	规格
一步法 TUNEL 原位细胞凋亡流式检测试剂盒 (绿色, AF488)	JXF60161F	20T

### 产品组分

产品编号	产品名称	20 Assays	Storage
JXF60161F-A	TdT Equilibration Buffer	9 mL	-20°C
JXF60161F-B	TdT Enzyme	100 μL×2	-20°C
JXF60161F-C	Labeling Solution (AF 488)	20 μL×2	-20°C
JXF60161F-D	Fixation Buffer	6 mL	-20°C
JXF60161F-E	Permeabilization Buffer	6 mL	-20°C
JXF60161F-F	Stop Solution	20 mL	-20°C

### 产品简介

One-step TUNEL Flow Cytometry Apoptosis Kit 是一款灵敏度高且能快速简便地检测细胞凋亡的产品。本试剂盒可通过流式细胞仪来进行悬浮细胞、贴壁细胞的流式凋亡检测。

### 检测原理

细胞在发生凋亡时，会激活一些特异性的DNA内切酶，这些内切酶会切断核小体间的基因组DNA。使得凋亡细胞的DNA被切割成180~200bp片段，在琼脂糖凝胶上通常以180~200bp的阶梯状迁移。细胞经过固定破膜后，TdT酶（脱氧核糖核酸末端转移酶）将荧光标记的dUTP连接到细胞断裂DNA暴露的3'-OH末端，通过流式细胞仪检测dUTP偶联物发出的荧光信号，从而检测晚期凋亡。

### 检测样本类型

#### 悬浮细胞

#### 贴壁细胞

### 保存条件

-20°C保存，保质期一年。Labeling Solution需避光保存，Labeling Solution、Fixation Buffer、Permeabilization Buffer需避免反复多次冻融，建议分装保存。

### 自备试剂及仪器

#### 1) 试剂

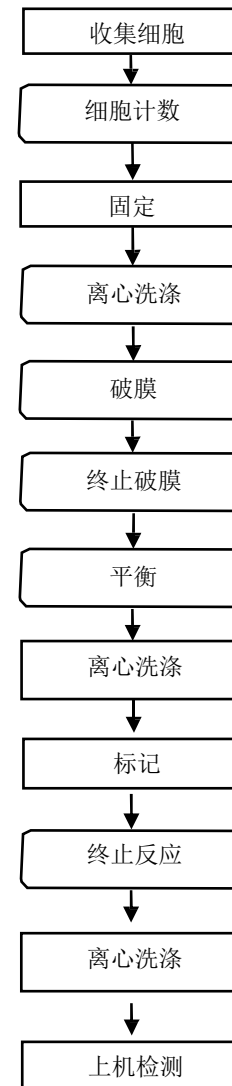
PBS (含1%BSA) 缓冲液 (pH7.2~7.4)。

注：PBS (含1%BSA) 缓冲液 (pH7.2~7.4)，目的是减少离心造成的细胞损失。

#### 2) 仪器 流式细胞

仪、离心机。

### 实验流程



样本预处理

标记与检测

## 对照设置

- 阴性对照：排除细胞本底、药物处理等原因产生的荧光背景以及非特异性染色造成的影响。准备一组细胞作为阴性对照，第8步标记工作液配制时不添加 TdT 酶，其余操作与实验组相同。

## 实验步骤

- 收集细胞并进行计数，每组取  $1 \times 10^6$  个细胞， $300 \times g$  离心 5 min，弃上清。注：若样本为贴壁细胞，凋亡细胞会有部分悬浮于上清中，上清中的细胞也要收集。
- 加入 200  $\mu$ L PBS (含 1%BSA) 重悬细胞，加入 200  $\mu$ L Fixation Buffer，室温固定 60 min (推荐使用摇转方式，或每 15 min 混匀一次)。
- 加入 1mL PBS (含 1%BSA)， $600 \times g$  离心 5 min，弃上清。
- 加入 200  $\mu$ L Permeabilization Buffer，冰上破膜 10 min。  
注：破膜温度过高或者时间过久会导致细胞破碎，因此建议 Permeabilization Buffer 解冻后放置在  $4^\circ\text{C}$ ，待使用前取出；另外破膜时间最长不要超过 15 min。
- 加入 1~2 mL PBS (含 1%BSA) 终止破膜，轻轻吹打混匀后， $600 \times g$  离心 5 min，弃上清。
- 加入 200  $\mu$ L TdT Equilibration Buffer，轻轻吹打混匀， $37^\circ\text{C}$  平衡 15 min。
- $600 \times g$  离心 5 min，弃上清，收集细胞沉淀。
- 按照分组参考下表配制标记工作液，每个样本加入 100  $\mu$ L 反应液 (充分混匀，现配现用)。

组分	检测样本	阴性对照
TdT Equilibration Buffer	70 $\mu$ L	80 $\mu$ L
Labeling Solution	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
TdT Enzyme	10 $\mu$ L	0 $\mu$ L

注：① TdT Equilibration Buffer 使用前，室温静置直至完全溶解。冰冻的平衡液融化后可能会出现钴盐结晶，此为正常现象。使用前涡旋混匀。

- ② Labeling Solution 使用前，请置于冰上溶解，待完全溶解后离心，用枪头吹打混匀。
- ③ TdT Enzyme 对温度较敏感，请严格保存于  $-20^\circ\text{C}$ ，使用前取出，使用后立即放回。
- ④ 配制标记工作液时，建议不要涡旋。

9.  $37^\circ\text{C}$  避光孵育 60 min (每 20 min 轻轻摇晃混匀细胞)。
10. 加入 1 mL Stop Solution 轻轻吹打混匀，室温静置 5 min，加入 300~500  $\mu$ L PBS(含 1%BSA)， $600 \times g$  离心 5 min，弃上清。
11. 加入 200  $\mu$ L PBS (含 1%BSA) 重悬细胞，上机检测。

## 检测

在流式细胞仪中选择合适的通道检测。

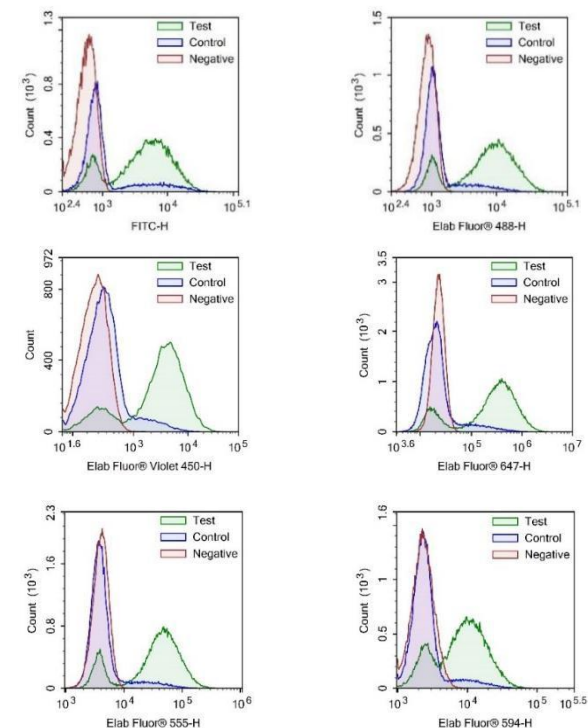
货号	AF 488	Ex/Em (nm)	Channel
JXF60161F	GenXion® AFF 488	495/520	FITC

注：为避免荧光淬灭，请尽快检测。

## 常见问题及解决方案

现象	可能原因	建议
细胞碎片较多	固定不充分，破膜导致细胞破碎。	适当延长固定的时间，充分固定细胞后再破膜。
	破膜时间过久，破膜温度较高。	破膜时间应控制在 10 min，最长不超过 15 min，保证在冰上破膜。
未检测到凋亡细胞群	细胞诱导凋亡失败。	设置不同的浓度梯度和诱导时间，找到合适的诱导条件。
	细胞数目较多，细胞透膜不彻底。	适当调整细胞数量，或增加 Permeabilization Buffer 的剂量，合理充分破膜。
	用含有 EDTA 等螯合剂的试剂洗涤细胞，导致 TdT 酶失效。	使用不含螯合剂的洗涤液。

## 结果展示



**Test:** HL-60 细胞用  $2.5 \mu\text{M}$  喜树碱 (Camptothecin) 处理 4 h。

**Control:** HL-60 细胞未加药处理。

**Negative:** HL-60 细胞用  $2.5 \mu\text{M}$  喜树碱 (Camptothecin) 处理 4 h，未加 TdT 酶。

## 注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 用于该试剂盒的检测样本最低细胞数目不低于  $5 \times 10^5$  个。
4. 实验中需要重悬细胞的步骤，用移液器轻轻吹打细胞 10~20 次，吹打时请勿将枪头中的液体完全吹出，避免造成细胞损伤和产生过多的气泡。
5. 离心去上清的操作要小心谨慎，避免造成细胞损失。
6. Labeling Solution 和 TdT Enzyme 应避免反复冻融和涡旋操作。

官方网址: <http://www.genesion.com.cn>

订货热线: 4006169114、020-84224925

Email: whiga22@126.com

