

一步法TUNEL流式凋亡检测试剂盒(红色, PriFluor 647)

货号: P-CA-088

产品简介

一步法 TUNEL 流式凋亡检测试剂盒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

产品组分

产品名称	20Assays	50Assays	100Assays	Storage
TdT Equilibration Buffer	9 mL	20 mL	40 mL	-5~-20°C
TdT Enzyme	100 μ L \times 2	250 μ L \times 2	250 μ L \times 4	-5~-20°C
Labeling Solution (PriFluor 647)	200 μ L \times 2	200 μ L \times 5	200 μ L \times 10	-5~-20°C, 避光
Fixation Buffer	6 mL	12.5 mL	25 mL	-5~-20°C
Permeabilization Buffer	6 mL	12.5 mL	25 mL	-5~-20°C
Stop Solution	20 mL	50 mL	100 mL	-5~-20°C
说明书			一份	

保存条件

-5~-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。



实验流程



样本预处理

pricella

标记与检测

pricella



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。

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 1×10^6 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 μ L PBS (含 1%BSA) 重悬细胞, 加入 200 μ 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 μ 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 $4^\circ C$, 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 μ L TdT Equilibration Buffer, 轻轻吹打混匀, $37^\circ C$ 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 μ 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 μ L	80 μ L
Labeling Solution	20 μ L	20 μ L
TdT Enzyme	10 μ L	0 μ L

注:

- 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盐结晶, 此为正常现象。使用前涡旋混匀。
- 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。
- TdT Enzyme 对温度较敏感, 请严格保存于 $-5 \sim -20^\circ C$, 使用前取出, 使用后立即放回。
- 配制标记工作液时, 建议不要涡旋。



- 37°C避光孵育60 min（每20 min轻轻摇晃混匀细胞）。
- 加入1 mL Stop Solution轻轻吹打混匀，室温静置5 min，加入300~500 μ L PBS(含1%BSA)，600 \times g离心5 min，弃上清。
- 加入200 μ L PBS（含1%BSA）重悬细胞，上机检测。

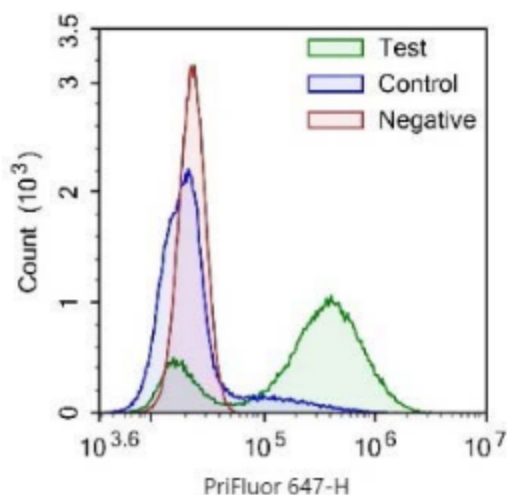
检测

在流式细胞仪中选择合适的通道检测。

Dye	Ex/Em (nm)	Channel
PriFluor 647	650/670	APC

注：为避免荧光淬灭，请尽快检测。

结果展示



Test: HL-60 细胞用 2.5 μ 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 μ M 喜树碱 (Camptothecin) 处理 4 h，未加 TdT 酶。



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 等整合剂的试剂洗涤细胞，导致 TdT 酶失效。	使用不含整合剂的洗涤液。

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 5×10^5 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。

