

# TUNEL Dilution Buffer

Pufferlösung, enthält Tris, Natriumcacodylat und  $\text{CoCl}_2$ .  
Der Puffer wird für Verdünnungen der terminalen Transferase im TUNEL Reaktionsmix (zur Detektion von Apoptose *in situ*) eingesetzt.

**Best. Nr. 1 966 006**

2 × 10 ml

**Version 3, November 1999**

Stabil bei 2-8°C

## 1. Einleitung

DNA-Fragmentierung wird als das biochemische Schlüsselereignis der Apoptose angesehen: sie führt zu einer Spaltung nukleärer DNA in Fragmente von Oligosomengröße (1). Deshalb wird dieser Prozeß für gewöhnlich zur Detektion der Apoptose durch die typische DNA-Leiter auf Agarosegelen während der Elektrophorese verwendet (2). Diese Methode kann jedoch weder Informationen hinsichtlich der Apoptose in individuellen Zellen liefern, noch die zelluläre Apoptose zur histologischen Lokalisation oder Zelldifferenzierung in Beziehung setzen.

Dies kann durch enzymatische *in situ* Markierung der DNA-Strangbrüche erfolgen, welche während der frühen Apoptose stattfinden. Sowohl DNA-Polymerase, als auch terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) (3, 4) werden verwendet, um markierte Nukleotide in partiell degradierte DNA einzuführen. Die Tailing-Reaktion unter Verwendung von TdT, auch ISEL [*in situ* end labeling (5)] oder TUNEL [(TdT-mediated dUTP nick end labeling (1, 6)] genannt, hat mehrere Vorteile im Vergleich zur *in situ* Nick Translation (ISNT) unter Verwendung von DNA Polymerase:

- Die Intensität der Markierung apoptotischer Zellen ist mit TUNEL im Vergleich zu ISNT höher, was zu einer höheren Sensitivität führt.
- Sehr schnelle Kinetik des Nukleotideinbaues mit TUNEL im Vergleich zu ISNT.
- TUNEL markiert bevorzugt apoptotische Zellen im Vergleich zu nekrotischen Zellen (7).

Für bestimmte Gewebeschnitte (hauptsächlich bei proliferierendem Gewebe) muß die Konzentration von TdT in unseren In Situ Cell Death Detection Kits angepaßt werden, da Okazaki-Fragmente oder andere intrazelluläre Ereignisse die Markierung beeinflussen können. Um dieses Problem der Überfärbung zu überwinden, kann eine Verdünnung der TdT-Komponente des In Situ Cell Death Detection Kits\* hilfreich sein.

## 2. Produktbeschreibung

**Inhalt** Pufferlösung mit 30 mM Tris/HCl, 140 mM Natriumcacodylat und 1 mM  $\text{CoCl}_2$ .

**Verwendung** Der TUNEL Verdünnungspuffer wird in Kombination mit den In Situ Cell Death Detection Kits verwendet [Fluorescein (Best. Nr. 1 684 795), POD (Best. Nr. 1 684 817) oder AP (Best. Nr. 1 684 809)].

**Haltbarkeit** Der TUNEL Verdünnungspuffer ist bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar (siehe chargenspezifischen Etiketaufdruck).  
Verdünnungen von TdT sollten unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und nicht gelagert werden. Das TUNEL Reaktionsgemisch ist bis zum Gebrauch auf Eis zu stellen.

## 3. Anwendungen

Der TUNEL Verdünnungspuffer dient der Verdünnung von TdT in der TUNEL-Reaktion für spezielle Anwendungen. Das TUNEL-Reaktionsgemisch wird zur Detektion von DNA-Strangbrüchen in Zellen und Geweben und zur Detektion und Quantifizierung des apoptotischen Zelltods auf der Einzelzellebene eingesetzt.

- Probenmaterial**
- Zellen in Suspension (6)
  - Cytospin- und Zellschmier-Präparationen
  - Adhärenz Zellen, kultiviert auf „chamber slides“(8)
  - Gefrierschnitte oder Formalin-fixierte, in Plastik oder Paraffin eingebettete Gewebeschnitte (3).

## 4. Arbeitsvorschriften

### 4.1 Allgemeine Anmerkungen

Der In Situ Cell Death Detection Kit ist wie in der entsprechenden Packungsbeilage beschrieben zu verwenden. Parallel hierzu werden Verdünnungen von TdT für die Gewebeschnitte verwendet, um falsch positive Markierungen zu vermeiden.

### 4.2 Verdünnungen von TdT

Folgende Verdünnungen von TdT werden empfohlen: 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100.

**Tabelle:** Volumina zur Anfärbung von Gewebeschnitten

TdT Verdünnung	TdT	TUNEL Verdünnungspuffer	Gesamt-volumen der TdT-Verdünnung
unverdünnt	5 µl aus Kit-Röhrchen 1	-	5 µl
1:2	5 µl aus Kit-Röhrchen 1	5 µl	10 µl
1:3	5 µl aus Kit-Röhrchen 1	10 µl	15 µl
1:5	5 µl aus Kit-Röhrchen 1	20 µl	25 µl
1:10	5 µl aus 1:5	5 µl	10 µl
1:50	5 µl aus 1:10	20 µl	25 µl
1:100	10 µl aus 1:50	10 µl	20 µl

Nacheinander 5 µl der TdT-Verdünnung mit 45 µl des Kit-Röhrchens 2 mischen (Markierungslösung) und die resultierenden 50 µl für den Gewebeschnitt verwenden (siehe Packungsbeilage).

#### 4.3 Auswertung der Färbung

Die Verdünnungen sind anhand der mikroskopischen Prüfung zu bewerten. Die Spezifität der Färbung erhöht sich mit der Verdünnung, falls eine Überfärbung mit den unverdünnten Kit-Komponenten beobachtet wird. Bei einem bestimmten Verdünnungsgrad ist die TUNEL-Reaktion optimal und das Signal vermindert sich bei weiterer Verdünnung von TdT.

Die Pufferlösung enthält 140 mM Na-cacodylat. Giftig beim Einatmen und Verschlucken. Bei der Arbeit nicht essen, trinken, rauchen. Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, diesen Beipackzettel vorzeigen).

#### 5. Literatur

- 1 Bortner, C.D. et al. (1996) *Trends in Cell Biol.* **5**, 21.
- 2 Wyllie, A.H. (1980) *Nature* **284**, 555.
- 3 Gavrieli, Y. et al. (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 493-501.
- 4 Darzynkiewicz, Z. et al. (1994) *Methods Cell Biol.* **41**, 15
- 5 Gorczyca, W. et al. (1994) *Cytometry* **15**, 169-175.
- 6 Sgonc, R. et al. (1994) *Trends Genetics* **10**, 41-42.
- 7 Gold, R. et al. (1994) *Lab Invest* **71**, 219.
- 8 Mochizuki, H. et al. (1994) *Neurosci. Lett.* **170**, 191-194.

\* zu beziehen von Roche Molecular Biochemicals

#### 6. Produkte für die Apoptose-Forschung

Apoptosis-specific physiological change	Detection method	Products	Cat. No.	
<b>DNA fragmentation</b>	• Gel Electrophoresis • <i>In situ</i> assay	• Apoptotic DNA-Ladder Kit	1 835 246	
		• In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red	2 156 792	
		• In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	1 684 795	
		• In Situ Cell Death Detection Kit, AP	1 684 809	
		• In Situ Cell Death Detection Kit, POD	1 684 817	
	• ELISA	<b>Single reagents for TUNEL and supporting reagents:</b>		
		• TUNEL AP	1 772 457	
		• TUNEL POD	1 772 465	
		• TUNEL Enzyme	1 767 305	
		• TUNEL Label Mix	1 767 291	
• TUNEL Dilution Buffer	1 966 006			
• Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup>	1 774 425			
• Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> , 10x	1 920 685			
• Cellular DNA Fragmentation ELISA	1 585 045			
<b>Cell membrane alterations</b>	• Microscopy or FACS	• Annexin-V-AlexaTM 568	1 985 485	
		• Annexin-V-Biotin	1 828 690	
		• Annexin-V-FLUOS	1 828 681	
		• Annexin V FLUOS Staining Kit	1 858 777	
<b>Enzymatic activity</b>	• Western Blot • FIENA • In situ Assay	• Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerase	1 835 238	
		• Caspase 3 Activity Assay	2 012 952	
		• M30 CytoDEATH (formalin grade)	2 140 322	
		• M30 CytoDEATH, Fluorescein	2 140 349	
<b>Expression of apoptosis-related proteins</b>	• Apoptosis Induction • In situ Assay/ Western Blot	• Anti-Fas	1 922 432	
		• Anti-Bcl-2	1 624 989	
		• Anti-p53 (pan)	1 810 928	
		• Anti-p53, Biotin	1 810 936	
		• Anti-p53, POD	1 810 944	
	• ELISA	• p53 ELISA	1 828 789	

E-mail Address	Country
argentina.biochem@roche.com	Argentina
biochem.au@roche.com	Australia
Gerhard.Muehlbauer@roche.com	Austria
biochem.be@roche.com	Belgium
Valent@mbox.cit.bg	Bulgaria
africhem@camnet.cm	Cameroon
biochem.ca@roche.com	Canada
biochem.cn@roche.com	China
Info@medisell.com.cy	Cyprus
Bm-comp@bm-comp.cz	Czech Republic
dk.biochem@roche.com	Denmark
ou.melestrum@neti.ee	Estonia
pharsc.et@telecom.net.et	Ethiopia
helsinki.biochem_diagnostics@roche.com	Finland
biochem.fr@roche.com	France
biochemInfo.de@roche.com	Germany
Bm_roche@hotmail.com	India
h.hajian@tebtech.com	Iran
tubanegin@istn.irost.com	Iran
Dyn@netvision.net.il	Israel
it.biochem@roche.com	Italy
bmkkbio@cet.co.jp	Japan
pharmakp@net2000ke.com	Kenya
Bmskorea@chollian.net	Korea
react@ncc.moc.kw	Kuwait
Raitis@invitros.lv	Latvia
Sakkijha@rdleb.com	Lebanon
Gintaras@eksma.lt	Lithuania
diagnostics@prophaclu	Luxembourg
Vocl@vol.net.mt	Malta
Aiouche.echo@dounia.net.ma	Morocco
biocheminfo.nl@roche.com	Netherlands
biochem.nz@roche.com	New Zealand
bofungwu@linkserve.com.ng	Nigeria
biochem.se@roche.com	Norway
biochem.pt@roche.com	Portugal
Topdiag@fx.ro	Romania
biochem.sg@roche.com	Singapore
roche.diagnostics@siol.net	Slovenia
south_africa.bioboffin@roche.com	South Africa
biochem.es@roche.com	Spain
biochem.se@roche.com	Sweden
BiochemInfo.CH@roche.com	Switzerland
Jean-Marie.kindbeiter@roche.com	Tunisia
bmuae@emirates.net.ae	United Arab Emirates
uk.biochem@roche.com	United Kingdom
biochemts.us@roche.com	USA
Mvalentiner@telcel.net.ve	Venezuela
dusica@eunet.yu	Yugoslavia
biochemts.row@roche.com	All other countries

<http://biochem.roche.com/pack-insert/1966006.pb.pdf>

Apoptosis special interest site:

<http://biochem.roche.com/techserv/apoptosis/index.htm>

**Argentina** 541 954 5555; **Australia** (02) 9899 7999; **Austria** (01) 277 87; **Belgium** (02) 247 4930; **Brazil** +55 (11) 3666 3565; **Bulgaria** +35929625408; **Cameroon** 237-370269; **Canada** (450) 086 7050; (800) 361 2070; **Chile** 00 56 (2) 22 33 737 (central) 00 56 (2) 22 32 099 (Exec); **China** 86 21 6427 5586; **Colombia** 0057-1-3412797; **Cyprus** +357-2-311362; **Czech Republic** (0324) 45 54, 58 71-2; **Denmark** +45 363 999 58; **Egypt** 20-2-3619047; **Estonia** 372-7-447600; **Ethiopia** 251-1-552799; **Finland** +358 9 525 333 66; **France** 04 76 76 30 87; **Germany** (0621) 759 8568; **Greece** 3 (01) 67 40 238; **Hong Kong** (852) 2485 7596; **India** +91-22-8379906; **Indonesia** 62 (021) 252 3820 ext. 755; **Iran** +98-21-8072374 / +98-21-8797027; **Israel** 972-6- 6380569; **Italy** 039 247 4109-4181; **Japan** 03 3432 3155; **Kenya** +254-2-750112; **Korea** 82-2-3471-6500; **Kuwait** +965-4837859; **Latvia** 371-787828309; **Lebanon** Fax: 00961-1-399667; **Lithuania** 370-2-729715; **Luxembourg** +352-496098; **Malta** Fax: +356-341087; **Morocco** Fax: +212-2-944040; **Malaysia** 60 (03) 755 5039; **Mexico** (5) 227 8967; **Netherlands** (036) 539 4911; **New Zealand** (09) 276 4157; **Nigeria** +234-1-521767; **Norway** (47) 23 373300; **Philippines** (632) 810 7246; **Poland** +48 (22) 22 66 84 305; **Portugal** (01) 4171717; **Republic of Ireland** 1 800 40 90 41; **Romania** +40-1-2123763; **Russia** (49) 621 759 8636 Fax: (49) 621 759 8611; **Saudia Arabia** +966-1-4010364; **Singapore** 0065 272 9200; **Slovenia** +386 61 1363528; **South Africa** (011) 886 2400; **South Korea** 02 569 6902; **Spain** (93) 201 4411; **Sweden** (08) 404 8800; **Switzerland** +41 (41) 799 6161; **Taiwan** (02) 736 7125; **Thailand** 66 (2) 274 07 08 (12 line); **Turkey** 0090 212 216 32 80; **United Arab Emirates** +971-4-694351; **United Kingdom** (0800) 521578; **USA** (800) 428 5433. **Venezuela** Fax: +0058-4810697; **Yugoslavia** +381 11 137163.



Roche Diagnostics GmbH  
Roche Molecular Biochemicals  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany