

TUNEL Apoptosis Detection Kit (Green Fluorescence)

Cat# CA0301

产品概述

末端脱氧核苷酸转移酶-dUTP 缺口末端标记（TUNEL）法是细胞凋亡研究中应用最广泛的原位检测方法。程序性细胞死亡或凋亡机制是毒理学分析和药物发现的关键方面。根据细胞程序性死亡过程中的细胞变化，细胞凋亡可分为早期、中期和晚期。细胞凋亡的后期以核形态、染色质凝聚、核膜降解和 DNA 断裂的变化为特征。TUNEL 检测细胞凋亡原理为：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。基因组 DNA 断裂时，暴露的 3'-OH 可以在末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）的催化下加上绿色荧光探针荧光素（FITC）标记的 dUTP (fluorescein-dUTP)，从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测。

本试剂盒为一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒，灵敏度高、特异性强、使用方便快捷。对于经过固定和洗涤的组织样本（石蜡切片、冰冻切片）和细胞样本（贴壁细胞、悬浮细胞），只需经过一步染色，洗涤后便可以进行凋亡检测。本试剂盒还提供了 DNase I 阳性对照和 Proteinase K，以便操作。另外，TUNEL 法特异性检测细胞凋亡时产生的断裂 DNA，但不会检测出射线等诱导的断裂 DNA。这样一方面可以把凋亡和坏死区分开，另一方面也不会把射线等诱导发生 DNA 断裂的非凋亡细胞判断为凋亡细胞。极少数细胞凋亡时没有 DNA 断裂，此时不适用 TUNEL 法检测。在个别类型的坏死细胞中也发现 TUNEL 检测呈阳性。在需要严格判断细胞凋亡的情况下，最好同时检测多个凋亡指标。

产品/组分信息

组分编码	产品组分	CA0301-20T	CA0301-50T
CA0301-20T/50T-1	TdT Dilution Buffer *	500 µL	1.25 mL
CA0301-20T/50T-2	TdT Enzyme (10×)	100 µL	250 µL
CA0301-20T/50T-3	FITC-12-dUTP Labeling Mix	900 µL	1.13 mL×2
CA0301-20T/50T-4	Proteinase K (2 mg/mL)	40 µL	100 µL
CA0301-20T/50T-5	DNase I (0.5 mg/mL)	5 µL	13 µL
CA0301-20T/50T-6	10×DNase I Buffer	100 µL	250 µL

*为选用产品

储存方式

-25~-15℃保存；FITC-12-dUTP Labeling Mix 需避光保存。

使用说明

所需物料

PBS 或 HBSS 缓冲液，抗荧光衰减封片剂、组织固定液或 4%多聚甲醛，Triton X-100，二甲苯，无水乙醇等

样本预处理

1. 对于贴壁细胞或细胞涂片

- 1.1 洗涤：PBS 或 HBSS 洗涤一次。如果细胞贴得不牢，可以干燥样品使细胞贴得更牢。
- 1.2 固定：使用免疫染色固定液或 4%多聚甲醛固定细胞 30 min。
- 1.3 洗涤：用 PBS 或 HBSS 洗涤一次。
- 1.4 通透：加入适量通透液（建议使用含 0.3% Triton X-100 的 PBS），室温孵育 5 min。
- 1.5 洗涤：用 PBS 或 HBSS 洗涤 2-3 次。

【注】：

1. 通透液需洗涤干净，以免干扰后续标记反应。
2. Triton X-100 有助于后续步骤中染色试剂的通透。孵育时间过短可能造成透性不充分从而影响标记效率，孵育时间过长则会增加细胞在后续洗涤步骤中脱落的风险。为得到最好的结果，需要自行优化通透温度和时间。

2. 对于悬浮细胞或细胞悬液

- 2.1 洗涤：收集细胞（建议 $50 \sim 200 \times 10^4$ 个细胞），PBS 或 HBSS 洗涤一次。
- 2.2 固定：使用免疫染色固定液或 4%多聚甲醛固定细胞 30 min。为防止细胞聚集成团，应置于摇床上缓慢摇动进行固定。
- 2.3 洗涤：用 PBS 或 HBSS 洗涤一次。
- 2.4 通透：加入适量通透液（建议使用含 0.3% Triton X-100 的 PBS），室温孵育 5 min。
- 2.5 洗涤：用 PBS 或 HBSS 洗涤 2-3 次。

【注】：

1. 通透液需洗涤干净，以免干扰后续标记反应。
2. Triton X-100 有助于后续步骤中染色试剂的通透。孵育时间过短可能造成透性不充分从而影响标记效率，孵育时间过长则会增加细胞破裂的风险。为得到最好的结果，需要自行优化通透温度和时间。

3. 对于石蜡包埋组织切片

- 3.1 脱蜡：室温下将石蜡切片放入二甲苯中浸泡 5-10 min，更换新鲜的二甲苯再浸泡 5-10 min，以彻底脱掉石蜡。
- 3.2 水化：在无水乙醇中浸泡 5 min，更换新鲜的无水乙醇再浸泡 5 min。在梯度乙醇（90、80、70%）中各浸洗 1 次，每次 3 min，逐渐增加水分。
- 3.3 洗涤：用 PBS 或 HBSS 轻轻润洗切片，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体。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，以便后续操作。在实验过程中，切勿使样品干燥，处理好的样本应置于湿盒中保持湿润。
- 3.4 通透：用 PBS 按照 1: 100 的比例稀释 Proteinase K (2 mg/mL)，使其终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 。每个样本上滴加 100 μL 的 Proteinase K (20 $\mu\text{g/mL}$)，使溶液覆盖全部样本区域，20-37°C 孵育 15-30 min。
- 3.5 洗涤：用 PBS 或 HBSS 润洗样本 2-3 次，轻轻吸干多余液体，处理好的样本置于湿盒中保持湿润。

【注】：

1. Proteinase K 需洗涤干净，以免干扰后续标记反应。
2. Proteinase K 有助于后续步骤中染色试剂的通透。孵育时间过短可能造成透性不充分从而影响标记效率，孵育时间过长则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。为得到最好的结果，需要自行优化 Proteinase K 孵育的温度和时间。

4. 对于冰冻切片

- 4.1 固定：取出冰冻切片，恢复至室温。使用组织固定液或 4%多聚甲醛固定 30 min。
- 4.2 洗涤：轻轻吸干多余液体，并将切片浸没在 PBS 或 HBSS 中，室温孵育 10-15 min。按此步骤重复洗涤一次，然后轻轻吸干多余液体。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，以便后续操作。在实验过程中，切勿使样品干燥，处理好的样本应置于湿盒中保持湿润。
- 4.3 通透：用 PBS 按照 1: 100 的比例稀释 Proteinase K (2 mg/mL)，使其终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 。每个样本上滴加 100 μL 的 Proteinase K (20 $\mu\text{g/mL}$)，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 10 min。

4.4 洗涤：在 PBS 或 HBSS 中浸没洗涤样本 2-3 次，并用滤纸轻轻吸干多余液体。处理好的样本置于湿盒中保持湿润。

【注】：

- 1. Proteinase K 需洗涤干净，以免干扰后续标记反应。
- 2. Proteinase K 有助于后续步骤中染色试剂的通透。孵育时间过短可能造成透性不充分从而影响标记效率，孵育时间过长则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。为得到最好的结果，需要自行优化 Proteinase K 孵育的温度和时间。

DNase I 处理阳性对照（可选）

- 1. 用去离子水按 1: 10 的比例稀释 10×DNase I Buffer（例如：每个样本需用 200 μL 1×DNase I Buffer，即用 20 μL 10×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 5 min。向剩余 100 μL 1×DNase I Buffer 中加 1 μL DNase I (0.5 mg/mL)，使其终浓度为 5 μg/mL。
- 2. 轻轻叩掉或吸掉液体，加入 100 μL 含 5 μg/mL DNase I 的缓冲液，室温孵育 10 min。
- 3. 用 PBS 或 HBSS 洗涤 3-4 次。

【注】：DNase 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，经上述流程处理后通常会引起大多数细胞显现绿色荧光。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。

配制 TUNEL 检测液

【注】：此步骤注意避光操作。

计算好样本数量（包括实验组和阳性对照组），参考表 1 配制适当量的 TUNEL 检测液，即用即配，注意避光。对于涂片、切片或 96 孔板的一个孔，所需体积是 50 μL，用 50 μL 乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需 TUNEL 检测液的总体积。对于表面积更大的样本（如 48 孔板、24 孔板、12 孔板、6 孔板的一个孔），可成比例增大试剂体积。

表 1 准备用于实验或阳性对照反应的 TUNEL 检测液

组分	1 个样品	5 个样品	10 个样品
TdT Enzyme (10×)	5 μL	25 μL	50 μL
FITC-12-dUTP Labeling Mix	45 μL	225 μL	450 μL

【注】：

- 1. 阴性对照体系为不含 TdT Enzyme 的 TUNEL 检测液，即用 ddH₂O 替代 TdT Enzyme (10×)。如果 TUNEL 反应过强造成荧光背景高，可以用本试剂盒提供的 TdT Dilution Buffer 稀释 TdT Enzyme (10×)，即配制 TUNEL 检测液时，减少 TdT Enzyme (10×)的量，加入相应量的 TdT Dilution Buffer。
- 2. 若配制 TUNEL 检测液操作时间较长，请将 TdT Enzyme (10×)、FITC-12-dUTP Labeling Mix 和配好的检测液置于冰上暂时保存。

标记与检测

【注】：此步骤注意避光操作。

1. 对于贴壁细胞、细胞涂片或组织切片

1.1 在样品上加 50 μL TUNEL 检测液，37℃ 避光孵育 60 min。

【注】：50 μL TUNEL 检测液适合涂片、切片或 96 孔板、48 孔板、24 孔板或 12 孔板的一个孔，如果是 6 孔板中的一个孔 TUNEL 检测液宜使用 100 μL。如果待检测的样品为涂片、切片或在 24 孔板、12 孔板或 6 孔板中，可以使用防蒸发膜，或自行尝试使用自封袋或者其它适当材料自行裁剪成比孔略小的圆形塑料片，滴加 TUNEL 检测液后覆盖在样品上，可以防止 TUNEL 检测液蒸发，并且使 TUNEL 检测液均匀覆盖样品。自行裁剪圆片时需要连着圆片突出一个角或连着一一条，并将圆形之外的突出部分折叠，方便染色结束后利用突出部分顺利取出圆片。也可以用 PAP Pen 圈出一个区域进行染色。孵育时需注意在多余的孔和多孔板的空隙中加入适量水以保持湿润，从而尽量减少 TUNEL 检测液的蒸发。

1.2 PBS 或 HBSS 洗涤 3 次。

1.3 用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。可以使用的激发波长范围为 450-500 nm，发射波长范围为 515-565 nm（绿色荧光）。

2. 对于悬浮细胞或细胞悬液

2.1 加入 50 μ L TUNEL 检测液，37°C 避光孵育 60 min。

2.2 PBS 或 HBSS 洗涤 2 次。

2.3 用 250-500 μ L PBS 或 HBSS 重悬细胞。

2.4 此时可以用流式细胞仪进行检测或涂片后在荧光显微镜下观察。可以使用的激发波长范围为 450-500 nm，发射波长范围为 515-565 nm（绿色荧光）。

【注】：结果分析时，在坏死的晚期阶段或在高度增殖/代谢的组织细胞中可产生大量 DNA 片断，从而引起假阳性结果；而有些类型的凋亡性细胞死亡缺乏 DNA 断裂或 DNA 裂解不完全，以及细胞外的矩阵成分阻止 TdT 进入胞内反应，进而产生假阴性结果。

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

CYTOCH