TUNEL 凋亡检测试剂盒（FITC）

产品编号：M008

包装规格：20T

产品简介

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，形成 180-200 bp 核小体 DNA 多聚体。因此在细胞凋亡晚期，DNA 会被降解为 180-200 bp 的片段，断裂的基因组 DNA 上暴露出大量的 3'-OH 末端。

暴露的 3'-OH 可以在末端脱氧核苷酸转移酶（Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, 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，这就是 TUNEL（TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling）法检测细胞凋亡的原理。

本试剂盒应用范围广，适用于石蜡组织切片，冰冻组织切片、细胞爬片、细胞涂片等的细胞凋亡检测。

试剂盒组成

组分	20T
Recombinant TdT Enzyme	20μL
FITC-12-dUTP Labeling Mix	100μL
Equilibration Buffer	2×1mL
Proteinase K（200 μg/mL）	400μL

保存：-20℃避光保存，一年有效。

注意事项

- ✓ 本产品仅限于科学研究使用。
- ✓ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套和口罩操作。
- ✓ 微量试剂取用前请离心收集。
- ✓ 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，同时需自备含 0.3% Triton X-100 的 PBS。
- ✓ 如需染核，需自备 DAPI（2 μg/mL）或 PI（1 μg/mL）。
- ✓ 如需阳性对照实验，需自备 DNase I。
- ✓ 如果用流式细胞仪，自备 PI（1 μg/mL）和 RNase A （DNase Free）。

操作说明

1. 样品准备

A. 石蜡组织切片

1) 室温下将石蜡组织切片放入二甲苯中浸泡 5-10 min，重复 2-3 次；然后无水乙醇浸泡 5 min，重复 2 次；最后用梯度乙醇（85%、75%、双蒸水）各浸泡 1 次，每次 5 min。

2) 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的液体。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。

3) 配制 Proteinase K 工作液：按 1:9 的比例，用 PBS 作为稀释液来稀释 200μg/mL 的 Proteinase K 溶液，使其终浓度为 20μg/mL。

4) 每个样本上滴加 100 μL 上述 Proteinase K 工作液，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波片上脱落的风险，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。

5) 用 PBS 溶液浸润清洗样本 3 次，每次 5 min（Proteinase K 需洗涤干净，否则会干扰后续的标记反应），处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

B.冰冻组织切片

1) 将玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液（溶于 PBS）中固定，室温下孵育 10-15 min。

2) PBS 洗涤 2 次，每次 10min。

3) 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。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。

4) 配制 Proteinase K 工作液：按 1:9 的比例，用 PBS 作为稀释液来稀释 200μg/mL 的 Proteinase K 溶液，使其终浓度为 20 μg/mL。

5) 每个样本上滴加 100 μL 上述 Proteinase K 工作液，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波片上脱落的风险，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。

6) 用 PBS 溶液浸润清洗样本 3 次，每次 5 min（Proteinase K 需洗涤干净，否则会干扰后续的标记反应），处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

C. 贴壁细胞或细胞涂片

1) PBS 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。

2) 4%多聚甲醛固定细胞 10-15min，PBS 洗涤一次。

3) 加入含 0.3% Triton X-100 的 PBS，室温孵育 5min。

4) PBS 洗涤样本 2 次，并保持样本湿润。

D.悬浮细胞或细胞悬液

1) 收集细胞（不超过 200 万细胞），PBS 洗涤一次。

2) 4%多聚甲醛固定细胞 10-15min。为防止细胞聚集成团，宜在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动的同时进行固定。

3) 离心并用 PBS 洗涤一次。

4) 用含 0.3% Triton X-100 的 PBS 重悬细胞，室温孵育 5min。

5) 离心并用 PBS 洗涤样本 1 次。

2. DNA 酶处理阳性对照的步骤（可选）

在样本通透处理后，用 DNA 酶 I 处理细胞会引起染色体 DNA 的断裂，产生许多可标记的 DNA 3'-末端，该流程通常会引起被处理的大多数细胞显现绿色荧光，因此作为阳性对照。

1) 将 100 μL 1×DNase I Buffer（配制方法：取 10 μL 10×DNase I Buffer，然后加入 90 μL 去离子水混匀）滴加到已通透的样本上，室温孵育 5 min；

2) 轻轻去掉多余液体，加入 100 μL 含有 DNase I（20 U/mL）的工作液（配制方法：取 10 μL 10×DNaseI Buffer，然后加入 2 μL DNase I，再加入 88 μL 去离子水混匀），室温孵育 10 min；

3) 轻轻去掉多余的液体，并将载玻片在装有 PBS 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。

3. 标记与检测

A.对于组织切片、贴壁细胞及细胞涂片

1) 平衡：每个样本滴加 50 μL Equilibration Buffer 使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 10 min。

2) 标记液配制：在冰上解冻 FITC-12-dUTP Labeling Mix 和 Equilibration Buffer，并按照 Recombinant TdTenzyme：FITC-12-dUTP Labeling Mix：Equilibration Buffer=1 μL：5 μL：50 μL（1：5：50）比例混合足够用于所有实验的 TdT 孵育缓冲液，具体实验使用试剂的体积可以根据玻片的大小进行适当等比例调整。

【注】配制好的 TUNEL 检测液必须一次使用完毕，不能冻存。

3) 阴性对照体系：准备一份不含 Recombinant TdT enzyme 的对照 TdT 孵育缓冲液，用 ddH2O 替代。

4) 标记：尽量去掉平衡的 Equilibration Buffer，然后在每份组织样本上加入 56 μL TdT 孵育缓冲液，在 37℃孵育 1 h；注意不能干片，载玻片要避光。

5) 立即用 PBS 润洗组织样本，清洗 4 次，每次 5 min。

6) 核染色：样本在染色缸中染色，在黑暗中将载玻片浸入装有 PI 溶液或者 DAPI 溶液（用 PBS 新鲜配制并稀释）的染色缸，室温放置 8 min。

7) 封片：样本染色完成后，用 PBS 清洗组织样本 3 次，每次 5 min，然后轻轻去掉多余液体，滴加抗荧光淬灭封片剂封片。

8) 镜检：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。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 FITC-12-dUTP 掺入而定位的绿色荧光。

B.悬浮细胞、细胞悬液

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

2) 在平衡细胞的同时，进行标记液配制：在冰上解冻 FITC-12-dUTP Labeling Mix 和 Equilibration Buffer，并按照 Recombinant TdTenzyme：FITC-12-dUTP Labeling Mix：Equilibration Buffer=1 μL：5 μL：50 μL（1：5：

50）比例混合足够用于所有实验的 TdT 孵育缓冲液（对于 2×10^6 个细胞的一个标准反应，其体积是 50 μL）。

3) 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℃孵育 60 min，避光。每隔 15 min 用微量移液器轻轻重悬细胞。

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

5) 300×g 离心 10 min，去上清并把沉淀重悬在 1mL 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。

6) 300×g 离心 10 min，去上清并把细胞沉淀重悬在 0.5 mL PI 溶液（1 μg/mL）中，其中包含 250 μg 无 DNA 酶的 Rnase A，在黑暗中室温孵育细胞 30 min。

7) 此时可以涂片后在荧光显微镜下观察或用流式细胞仪进行检测，测量 520±20 nm 的 FITC-12-dUTP 的绿色荧光和＞620 nm 的 PI 红色荧光。PI 将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色，只在凋亡细胞核中才有 FITC-12-dUTP 掺入而定位的绿色荧光。

常见问题解答

1. 出现非特异性荧光标记。
   a 有些细胞或组织，例如平滑肌细胞或组织，nuclease 或 polymerase 的酶活性水平较高，易导致出现非特异性的荧光标记。解决方法是，取细胞或组织后立即固定并且要充分固定，以阻止这些酶导致假阳性。
   b 使用了不适当的固定液，例如一些酸性固定液，导致出现假阳性。建议采用推荐的固定液。
   c TUNEL 检测反应时间过长，或 TUNEL 检测反应过程中反应液渗漏，细胞或组织表面不能保持湿润，也可能出现非特异性荧光。注意控制反应时间，并确保 TUNEL 检测反应液能很好地覆盖样品。
2. 荧光背景很高。
   a 支原体污染。请使用支原体染色检测试剂盒检测是否为支原体污染。
   b 高速分裂和增殖的细胞，有时也会出现细胞核中的 DNA 断裂。
   c 红细胞中血红蛋白导致的自发荧光产生严重干扰。此时宜选择其它细胞凋亡检测试剂盒。
3. 标记效率低。
   a 使用乙醇或甲醇固定会导致标记的效率较低。
   b 固定时间过长，导致交联程度过高。此时宜减少固定时间。
   c 荧光淬灭。荧光在普通光照 10 分钟就会严重淬灭。需注意避光操作。
   d 碘化丙啶双染时，如果碘化丙啶染色过深会导致观察到的本试剂盒的 TUNEL 染色效果减弱。碘化丙啶可以接受 fluorescein 激发产生的荧光，从而起到淬灭作用。可用较低浓度的碘化丙啶染色，例如 0.5μg/ml 碘化丙啶。
   e 贴壁细胞如果使用药物诱导凋亡，会使发生凋亡细胞的贴壁性会减弱，所以建议在凋亡诱导结束后，用可以对多孔板进行离心的离心机 1000g 离心 5 分钟，然后再吸除培养基并用 PBS 洗涤。如果没有适合的离心机，请注意操作轻缓，防止发生凋亡的细胞在洗涤时洗去。后续整个操作也需要轻缓。

示例

