



One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit (Green, AF488) 一步法 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (绿色, AF488)

产品简介

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。TdT 酶 (脱氧核糖核酸末端转移酶) 将标记的 dUTP 连接到断裂 DNA 暴露的 3'-OH 末端, 通过这些末端添加 FITC 或 Alexa Fluor 488 绿色荧光/Cy3 红色荧光标记的 dUTP 的方式来标记晚期凋亡细胞, 从而可以通过荧光显微镜或者流式细胞仪进行检测, 这就是 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法的检测细胞凋亡的原理。

本试剂盒应用范围广, 可用于检测冷冻或石蜡切片中的细胞凋亡情况, 也可检测培养的贴壁细胞或悬浮细胞的凋亡情况。可选择性的检测凋亡细胞, 而非坏死细胞或因辐照和药物治疗而造成的 DNA 链断裂的细胞。本试剂盒检测细胞凋亡, 耗时短, 只需一步染色反应, 洗涤后即可检测。

产品组成

| 组分 | FS0571 | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|----------------|
| | 一步法 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (绿色, AF488) | | | |
| 产品货号 | 20T | 50T | 100T | Storage |
| 试剂盒组分名称 | 20T | 50T | 100T | Storage |
| 试剂 A:TUNEL Equilibration Buffer | 2mL | 5ml | 2×5ml | -20℃避光, 避免反复冻融 |
| 试剂 B:488 TUNEL Reaction Buffer | 1mL | 2×1.25 mL | 4×1.25 mL | |
| 试剂 C:TdT Enzyme | 40ul | 100ul | 200ul | |
| 试剂 D:Proteinase K (2 mg/mL) | 40ul | 100ul | 200ul | |
| 试剂 E:DNase I (2 U/μL) | 5ul | 13ul | 26ul | |
| 试剂 F:10×DNase I Buffer | 100ul | 260ul | 520ul | |
| 使用说明书 | 1 份 | | | |

保存及运输: -20℃避光保存, 至少 1 年有效, 避免反复冻融。

自备材料: PBS 缓冲液 (1x, pH 值约为 7.4, (CAT:#FSH055)); 0.4% Triton X-100, (CAT:#FS0442) (PBS 配制); 0.1% Triton X-100 (PBS 配制, 其中含 5 mg/mL BSA); 4% 多聚甲醛 (CAT:#FS03101) (PBS 配制); 免疫组化笔; 脱蜡溶剂 (石蜡切片样本); 石蜡切片处理相关试剂: 抗荧光淬灭封片剂 (CAT:#FSM032/FSM033); ddH₂O

使用方法

实验组设计

A. 阳性对照: DNase I 处理制备阳性对照载玻片。DNase I 可以消化单链或双链 DNA 暴露 3'-OH 末端, 人为造成细胞凋亡。每次实验做一次即可。 (用来验证本次实验操作和试剂盒有无问题)

B. 阴性对照: 使用不含 TdT Enzyme 的 TUNEL Reaction Buffer, 用 ddH₂O 替代 TdT Enzyme。 (主要是排除细胞自身凋亡、操作



过程等原因导致的非特异性染色;以及调整拍摄曝光强度。)

C.实验处理组:实验组按照说明书正常操作。

D.实验对照组:实验组按照说明书正常操作。

一、样品的准备:

(1)用于贴壁细胞或细胞涂片

1.1). PBS 清洗 1-2 次。

【注:】如果担心细胞涂片的细胞贴得不牢,可以干燥样品使细胞贴得更牢。

1.2).细胞固定:加入适量 4%多聚甲醛(pH 7.4)溶液, 4°C放置固定 30 min 。

1.3).PBS 清洗细胞两次。

1.4).通透细胞:加入冰上预冷的 70%乙醇,在-20°C孵育 4 h。细胞能在 70%乙醇中-20°C的条件下保存一周。或者细胞可用配制于 PBS 中的 0.2% Triton X-100 溶液通透,室温放置 20 min 。

1.5) PBS 清洗细胞两次。

1.6) 转步骤二. TUNEL 反应。

(2)用于悬浮细胞或细胞悬液

2.1). 收集细胞(3-5×10⁶ 个细胞), 1000 rpm 离心 5min,PBS 清洗 2 次。

2.2). 细胞固定:加入适量 4%多聚甲醛(pH 7.4)溶液,充分重悬细胞,4°C放置固定 30 min。2000rpm 离心 5min。

2.3).PBS 清洗细胞两次。

2.4).通透细胞:加入适量 0.4% Triton X-100(PBS 配制),室温通透 20 min。

2.5) PBS 清洗细胞两次。

2.6) 转步骤二. TUNEL 反应。

(3) 用于石蜡组织切片

3.1).室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片2次,每次 5 min,以彻底脱掉石蜡。

【注】:二甲苯有毒,易挥发,请在通风橱中进行此操作。

3.2).室温下,将切片样本浸没于无水乙醇中漂洗 2 次,每次 5 min。

3.3).室温下,将切片样本连续浸没在不同浓度梯度的乙醇(95%、90%、80%、70%)中,每种浓度各漂洗 1 次,每次 5 min。

3.4).室温下,将切片浸没于纯水中漂洗 1 次,每次 3 min,再将切片浸没于 1×PBS 中漂洗 1 次,每次 3 min,用滤纸小心吸干切片样本周围多余液体。

3.5) 用免疫组化笔在切片样本周围描绘样品轮廓,以便下游通透与标记。

【注】:若在后续实验操作中发现免疫组化笔画的轮廓圈被破坏,需及时补画。

3.6) 按 1:50 的比例,将 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 1×PBS 稀释,使其终浓度为 40 μg/mL。每个样本上滴加 100 μL 稀释好的 Proteinase K 溶液,使溶液覆盖全部样本区域,室温孵育 20 min。(Proteinase K 的孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化)。

【注】:蛋白酶 K 可以帮助渗透组织,但延长孵育时间可能导致切片脱落,所以要最优化孵育时间长短。时间一般为 10~30 min,4 μm 左右的片子可以用 10 min,但 30 μm 左右的可用 30 min。过长易脱片、过短起不到通透效果。

3.7) PBS 浸润清洗切片两次,每次 5 min,用滤纸吸去多余的液体,将处理好的样品放在湿盒中保持湿润。**【注】:**这一步必须把蛋白酶 K 洗涤干净,否则会严重干扰后续标记反应。

3.8) 转步骤二. TUNEL 反应。



(4) 用于冰冻组织切片样品

- 4.1) 将冰冻切片放置于室温的片架上, 室温 20 min, 晾干。
- 4.2) 将载玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液 (in PBS) 中, 室温固定 30 min。
- 4.3) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min。

【注】:若是担心甲醛清洗不干净, 影响最终染色效果。可在甲醛固定完成后加入适量 2mg/mL 甘氨酸清洗 10 min, 中和残留的固定液, 再进行 PBS 清洗。

- 4.4) 用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。

【注】:若在后续实验操作中发现免疫组化笔画的轮廓圈被破坏, 需及时补画。

- 4.5) 按 1:50 的比例, 将 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 1 × PBS 稀释, 使其终浓度为 40 μg/mL。每个样本上滴加 100 μL 稀释好的 Proteinase K 溶液, 使溶液覆盖全部样本区域, 室温孵育 10 min。Proteinase K 的孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化)。

【注】: ProteinaseK 可通透细胞膜和核膜, 从而使后续步骤的染色试剂充分进入细胞核进行反应, 提高标记效率。孵育时间过长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, 过短则可能造成透性处理不充分为得到更好的结果, ProteinaseK 的浓度、孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化。如优化 Proteinase 时间仍无法改善染色效果, 可选择将样本浸入 1% TritonX-100(PBS 配制)中, 室温促渗 3-5 min;之后将切片样本浸入 XPBS 漂洗三次, 每次 5 min。

- 4.6) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min, 用滤纸吸去多余的液体, 将处理好的样品放在湿盒中保持湿润。

【注】: 这一步必须把蛋白酶 K 洗涤干净, 否则会严重干扰后续的标记反应。

- 4.7) 转步骤二. TUNEL 反应。

5) 阳性处理(仅阳性对照进行此步骤, 其他样品直接进行 TUNEL 反应步骤)

- 5.1) 按 1:10 的比例用 ddH₂O 将 10 × DNase I Buffer 稀释成 1 × DNase I Buffer 备用。
- 5.2) 滴加 100 μL 1 × DNase I Buffer 到已通透的样本上, 室温平衡 5 min。
- 5.3) 用 1 × DNase I Buffer 以 1:100 稀释 DNase I (2 U/μL), 使其为终浓度 20 U/mL 的工作液。
- 5.4) 轻轻吸掉多余液体, 加入 100 μL 浓度为 20 U/mL DNase I 工作液, 室温孵育 10 min。
- 5.5) 轻轻吸掉多余液体, PBS 清洗样品 2 次。

二、TUNEL 反应:

1)预先配制 TUNEL 反应混合液(即用即配)

| 组分 | 待测样品数量 | 1 个样本 | 5 个样本 | 10 个样本 |
|--------------|---------------------------|-------|-------|--------|
| 试剂 C: | TdT Enzyme 酶溶液(uL) | 2ul | 10ul | 20ul |
| 试剂 B: | 488 TUNEL Reaction Buffer | 48ul | 240ul | 480ul |
| TUNEL 反应液总体积 | | 50ul | 250ul | 500ul |

2)对于贴壁细胞、细胞涂片或组织切片

- a.每个样本加入 50μLTUNEL 反应液, 使反应液均匀覆盖样本。37°C避光孵育适宜的时间(细胞推荐染色时间 15-30 min, 组织染色时间推荐 1h)。

【注】:50 μL TUNEL 反应液适合涂片、切片或 96 孔板(其他不同孔板可以适当调整 TUNEL 反应液体积, 覆盖细胞即可)。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 反应液后覆盖在样品上, 可以防止 TUNEL 反应液蒸发, 并且使 TUNEL 反应液均匀覆盖样本

- b.弃去 TUNEL 反应液, PBS 清洗 2 次后, 再用 0.1% Triton X-100(PBS 配制, 其中含 5 mg/mL BSA)清洗 3 次, 每次 5 min, 这样游离的未反应的标记物可以清除较干净。

- c.(可选)每个样本加入适量浓度为 5 μg/mL 的 DAPI 染液, 室温避光孵育 5min。染色完成后, 弃去 DAPI 染液, PBS 清洗 2 次, 每次 5min。



d.(可选)切片封片:每个样本滴加 20 μ L 抗荧光淬灭封片剂(抗荧光淬灭封片剂可能会不适用于某些染料,实验前建议进行预实验测试匹配性), 盖上盖玻片, 用镊子的钝端轻轻敲击盖玻片, 去除气泡以使封片完全。

e.用滤纸吸去多余的液体, 向样本区域加 100 μ L PBS 保持样本湿润, 立即在荧光显微镜下观察。

(3)对于悬浮细胞或细胞悬液

a.每个样本管加入 50 μ L TUNEL 反应液轻轻重悬细胞, 37 $^{\circ}$ C避光孵育 15-30 min。每隔 10 min 用微量移液器轻轻重悬细胞。

b. 2000 rpm 离心 5 min, 弃去 TUNEL 反应液, 用 0.1% Triton X-100(PBS 配制, 其中含 5 mg/mL BSA)清洗 2 次, 每次 5 min, 这样游离的未反应的标记物可以清除较干净。

c.每个样本管加入 100 μ L 浓度为 5 μ g/mL 的 DAPI 染液, 室温避光孵育 5 min。

d.加入 400 μ L PBS 重悬细胞, 立即用流式细胞仪检测或进行涂片后在荧光显微镜下观察。

注意事项

- 1) 荧光染料均存在淬灭问题, 保存和使用过程中请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 2) 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
- 3) 染色背景较重或非特异性着色明显时可适当减少染色时间。
- 4) 实验时建议增加阴性对照和阳性对照组。
- 5) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

常见问题 Q&A

Q1:为什么出现了一些非特异标记?

A1:①有些细胞, 比如平滑肌核酸酶或聚合酶活性水平较高, 使得 DNA 全部被切断, 易导致假阳性。建议:取出细胞后要立即固定并充分固定, 以阻止这些酶的活性, 同时设置阴性对照。

②固定液浓度过高或过低, 导致中心部分细胞固定效果不佳, 而使得中心部细胞自溶、DNA 链出现不规则断裂, 产生假阳性。建议:推荐使用 4% 多聚甲醛。

③TdT 酶反应时间过长或 TUNEL 反应过程中反应液发生蒸发或渗漏, 细胞表面不能保持湿润。注意控制反应时间, 并确保 TdT 酶反应液能很好地覆盖样品。

4)有些试剂或细胞存在自发荧光, 选择染料时要避开自发荧光的颜色。

Q2:为什么没有染上荧光?

A2:①固定不充分。固定液首选 4% 多聚甲醛, 现用现配。不建议使用乙醇, 乙醇固定液的渗透力较弱, 影响 TUNEL 标记效率。

②细胞膜和核膜的通透不充分, TdT 酶未能到达核内。细胞可用 0.2% Triton X-100 溶液通透 5-30 min, 不同的细胞所需要的通透时间略有不同, 适当调整。

③延长标记时间至 2 h, 并适当增加 TdT 酶及 dUTP 的用量。

④确定实验对象细胞有凋亡。准备一份 DNaseI 处理的阳性对照, 验证 TdT 酶反应是否正确进行。

Q3:如何对细胞核进行复染?

A3:可在 TUNEL 反应结束后对细胞核进行染色。

Q4:为什么荧光背景高?

A4:①支原体污染:可以使用支原体染色检测试剂盒验证。

②TdT 酶反应时间过长, 可以用试剂盒提供的 TdT 酶稀释液将 TdT 酶稀释 2-5 倍后再按照说明书操作, 稀释后的 TdT 酶仅供当日使用。

③处于高速分裂和增殖状态中的细胞, 有时也会出现细胞核中的 DNA 断裂。建议:在非增殖期取样检测;

④有些试剂或细胞存在自发荧光, 选择染料时要避开自发荧光的颜色。

⑤DAB 孵育时间过长, 减少 DAB 染色时间。



⑥Biotin-X-dUTP 的非特异性结合, 在 TdT 酶反应之后, 再用含 0.1% Triton X-100 和 mg/ml BSA 的 PBS 洗三次。

Q5:标记率低?

A5:①乙醇、甲醇或甲醛(市面上购买的甲醛大多含有甲醇)固定的样品标记效率较低(因为在固定时染色体未能与蛋白质交联, 而在操作中丢失), 采用推荐的固定液。

②固定时间过长, 导致交联程度过高, 减少固定时间。

③贴壁细胞如果使用药物诱导凋亡, 会细胞皱缩, 贴壁黏附力降低, 导致凋亡细胞容易脱落。**建议:在凋亡诱导结束后, 可以对多孔板进行 1000g 离心 5 min, 然后再吸出培养基并用 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被洗去。后续整个操作也需要轻缓。**

相关产品

| 产品货号 | 产品名称 | 规格 |
|---------|--|--------------|
| FS0570 | TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (绿色, FITC) | 20T/50T/100T |
| FS0571 | TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (绿色, Alexa Fluor® 488) | 20T/50T/100T |
| FS0572 | TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (红色, Cy3) | 20T/50T/100T |
| FS0573 | TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (红色, Alexa Fluor® 594) | 20T/50T/100T |
| FS0574 | TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (白光,DAB) | 20T/50T/100T |
| FS1206 | 即用型 DAPI 染液(10 μ g/ml) | 10ml/50ml |
| FS0543 | TRIS-EDTA 抗原修复液 (50×) pH9.0 | 100mL |
| FSM0030 | 柠檬酸钠抗原修复液 50× | 100mL |
| FSH055 | 1×PBS 缓冲液 (pH7.2-7.4) | 500ml |
| FS1206 | 即用型 DAPI 染液(10 μ g/ml) | 10ml/50ml |
| FS0543 | TRIS-EDTA 抗原修复液 (50×) pH9.0 | 100mL |
| FS0521 | AnnexinV-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂 | 50T/100T |