

一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (橙红色, Cy3)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

-20℃避光保存, 有效期 12 个月。

产品编号	产品名称	产品规格
YFXCA13	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (橙红色, Cy3)	20T

产品组分

组分	规格
5 ×反应缓冲液	1mL
Cy3-dUTP Mix	100μL
TdT Enzyme	20μL
Proteinase K (2mg/mL)	40μL
DNase I (2U/μL)	5μL
10 ×Nase I Buffer	100μL

一、产品说明

翼飞雪一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (绿色, FITC) 提供了一种检测细胞和组织在凋亡过程中细胞核 DNA 断裂程度的方法, Ex/Em = 550/570nm。

细胞在发生凋亡时, 会激活一些特异性的 DNA 内切酶, 这些内切酶会将核小体间的基因组 DNA 切割成 180-200bp 的整数倍片段, 暴露出基因末端的 3'-OH。在正常或增殖的细胞中, 几乎没有 DNA 断裂, 因此 3'-OH 的形成很少。TdT 酶(脱氧核糖核酸末端转移酶)将绿色荧光标记的 dUTP 连接到断裂 DNA 暴露的 3'-OH 末端, 从而可以在荧光显微镜下进行检测。

本试剂盒可以用于检测冷冻或石蜡切片中的细胞凋亡情况, 也可以检测培养的贴壁细胞的凋亡情况。

二、自备材料

1、细胞样本或冰冻切片:

4%多聚甲醛固定液 (in PBS), 促渗试剂 (0.2% Triton X-100 in PBS)。

注: 可提前 1-2 天新鲜配制, 0.22μm 过滤除菌, 4℃储存备用。

2、石蜡切片

二甲苯, 无水乙醇

3、其他试剂

PBS, ddH₂O, 抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI)

三、操作步骤

1、细胞爬片样本:

1.1 样本预处理

A. 在所需合适大小的孔板中, 用 TC 处理的细胞爬片培养贴壁细胞, 经过凋亡诱导处理后, 用 PBS 漂洗载玻片 2 次。

B. 加入过量的 4%多聚甲醛, 完全浸没爬片, 4℃ 静置 25min, 进行细胞固定。

C. 用 PBS 溶液清洗 2-3 次, 每次室温放置 5min。

D. 加入过量的 0.2% Triton X-100, 室温通透 5min。

注: 优先推荐使用 Triton X-100 进行通透, 也可使用 Proteinase K (用 PBS 稀释 Proteinase K, 至其终浓度为 20 μ g/mL) 进行通透: 在每个样本上滴加 100 μ L 稀释好的 Proteinase K 溶液, 使溶液完全覆盖样本, 室温孵育 5min (此为推荐时间, 具体最佳时间须自行摸索)。通透时间最长不得超过 15min。

E. 用 PBS 溶液清洗 2-3 次, 每次室温放置 5min。

1.2 阳性对照 (可选)

A. 准备避光湿盒, 底部倒入一层水, 平展的铺上一层洁净的保鲜膜。

B. 用 ddH₂O 将 10 $\times$ DNase I Buffer 稀释至 1 $\times$, 滴加 100 μ L 的 1 $\times$ DNase I Buffer 至湿盒内的保鲜膜上, 将细胞爬片从孔板中取出, 细胞面向下盖住 1 $\times$ DNase I Buffer, 室温平衡 5min。

C. 用 1 $\times$ DNase I Buffer 将 DNase I 稀释至其终浓度为 20U/mL, 在保鲜膜上滴加 50 μ L 终浓度为 20U/mL 的 DNase I。

D. 取出细胞爬片, 轻轻吸干多余水分, 细胞面向下盖住 20U/mL 的 DNase I, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min。

E. 取出细胞爬片, 细胞面向上放入洁净的孔板中, 用过量的 PBS 洗涤 3 次, 每次洗涤 5min。

注: 阳性对照必需使用单独的染色缸或者孔板, 阳性对照上残余的 DNase I 可能会在实验组中造成假阳性的错误信号。

1.3 标记及检测

A. 准备避光湿盒, , 底部倒入一层水, 平展的铺上一层洁净的保鲜膜。

B. 用 ddH₂O 将 5 $\times$ 反应缓冲液稀释至 1 $\times$, 滴加 100 μ L 的 1 $\times$ 反应缓冲液至保鲜膜上, 将细胞爬片从孔板中取出, 细胞面向下盖住 1 $\times$ 反应缓冲液, 室温平衡 5min。

C. 平衡期间, 在冰浴和避光条件下按照下表配制标记液:

组分	阴性对照	阳性对照+样品
ddH ₂ O	35 μ L	34 μ L
5 $\times$ 反应缓冲液稀	10 μ L	10 μ L
Cy3-dUTP Mix	5 μ L	5 μ L
TdT Enzyme	0 μ L	1 μ L

D. 平衡结束后, 将标记液 50 μ L 滴加到洁净的保鲜膜上, 取出爬片, 用吸水纸吸干多余的液体, 盖住相应的标记液, 注意避光。

注: 标记液体积对于面积小于 5cm² 的反应, 所需体积是 50 μ L, 用 50 μ L 乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需 TdT 标记反应液的总体积。对于表面积更大的样本, 可按照比例增加试剂体积。

E. 盖紧湿盒盖子, 注意避光, 防止爬片干燥, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min。

F. 取出爬片, 轻轻去掉多余的液体, 放入新的孔板中, 用新鲜的 PBS 溶液清洗 2 次, 每次 5min。

注: 如果背景过高, 样本在用 PBS 清洗后, 可再用含 0.1% Triton X-100 和 5mg/mL BSA 的 PBS 洗 3 次, 每次 5min, 这样可以将游离的未反应标记物清除干净。

G. 在载玻片上滴加 1 滴抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI) 。

H. 取出爬片, 用吸水纸轻轻吸掉周围的溶液, 盖住载玻片的抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI), 并进行封片。

I. 立即在荧光显微镜下分析样本, 在激发/发射波长为 492/517nm 下观察绿色荧光, 或在激发/发射波长为 356/451nm 下观察 DAPI 的蓝色荧光。

2、细胞涂片样本:

2.1 样本预处理:

A. 细胞涂片: 按照 2×10^6 cells/mL 的浓度将细胞重悬于 PBS 中, 吸取 50-100 μ L 细胞悬浮液涂片在多聚赖氨酸包被的载玻片上, 晾干。

B. 将涂片浸入装有 4% 多聚甲醛的染色缸中, 4 $^{\circ}$ C 放置 25min 进行细胞固定。

C. 用 PBS 溶液清洗 2-3 次, 每次室温放置 5min。

D. 将涂片浸没于 0.2% Triton X-100 溶液中, 室温通透 5min。

注: 优先推荐使用 Triton X-100 进行通透, 也可使用 Proteinase K (用 PBS 稀释 Proteinase K, 至其终浓度为 20 μ g/mL) 进行通透: 在每个样本上滴加 100 μ L 稀释好的 Proteinase K 溶液, 使溶液完全覆盖样本, 室温孵育 5min (此为推荐时间, 具体最佳时间须自行摸索)。通透时间最长不得超过 15min。

E. 用 PBS 溶液清洗 2-3 次, 每次室温放置 5min。

F. 轻轻吸去多余液体, 并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

2.2 阳性对照 (可选)

A. 准备避光湿盒, 底部放入用水浸湿的纸巾, 载玻片全部转移到湿盒中。

B. 用 ddH₂O 将 10 $\times$ DNase I Buffer 稀释至 1 $\times$, 滴加 100 μ L 的 1 $\times$ DNase I Buffer 至已通透的样本上, 室温平衡 5min。

C. 用 1 $\times$ DNase I Buffer 将 DNase I 稀释至其终浓度为 20U/mL, 轻轻吸干载玻片的多余液体, 每个阳性对照样品滴加 100 μ L 终浓度为 20U/mL 的 DNase I, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min。

D. 轻轻吸干载玻片上的多余液体, 用 PBS 溶液清洗 2-3 次, 每次 5min。

注: 阳性对照必需使用单独的染色缸或者孔板, 阳性对照上残余的 DNase I 可能会在实验组中造成假阳性的错误信号。

2.3 标记及检测

A. 底部放入用水浸湿的纸巾, 载玻片全部转移到湿盒中。

B. 用 ddH₂O 将 5 $\times$ 反应缓冲液稀释至 1 $\times$, 滴加 100 μ L 的 1 $\times$ 反应缓冲液至湿盒内的样品上, 室温平衡 5-10min。

C. 平衡期间, 冰浴和避光条件下按照下表配制标记液:

组分	阴性对照	阳性对照+样品
ddH ₂ O	35 μ L	34 μ L
5 $\times$ 反应缓冲液稀	10 μ L	10 μ L
Cy3-dUTP Mix	5 μ L	5 μ L
TdT Enzyme	0 μ L	1 μ L

D. 平衡结束后, 用吸水纸吸干多余的液体, 在样本上滴加 50 μ L 的标记液, 注意避光。

注: 标记液体积对于面积小于 5cm² 的反应, 所需体积是 50 μ L, 用 50 μ L 乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需 TdT 标记反应液的总体积。对于表面积更大的样本, 可按照比例增加试剂体积。

E. 盖紧湿盒的盖子, 注意避光, 防止样本干燥, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min。

F. 轻轻吸去多余液体, 用新鲜的 PBS 溶液清洗 2-3 次, 每次 5min。

注: 如果背景过高, 样本在用 PBS 清洗后, 可再用含 0.1% Triton X-100 和 5mg/mL BSA 的 PBS 洗 3 次, 每次 5min, 这样可以将游离的未反应标记物清除干净。

G. 用吸水纸轻轻擦掉样本周围的液体, 样本上滴加 1 滴抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI)。

H. 用盖玻片盖住载玻片的抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI), 进行封片。

I. 立即在荧光显微镜下分析样本, 在激发/发射波长 492/517nm 下观察绿色荧光; 或在激发/发射波长 356/451nm 下观察 DAPI 的蓝色荧光。

3、石蜡包埋组织切片样本:

3.1 样本预处理

A. 室温下将切片浸入二甲苯脱蜡 2 次, 每次 5-10min, 以彻底脱掉石蜡。

注: 二甲苯有毒且易挥发, 请在独立设置的实验室或者通风橱中进行。低温可能会影响二甲苯脱蜡效果, 当室温低于 37℃时, 可将脱蜡时间延长至 20min。

B. 室温下将切片浸入无水乙醇浸泡润洗 2 次, 每次 5min。

C. 室温下依次将切片浸入 90%、80%、70%乙醇各一次, 每次 3min。

D. 用 PBS 浸泡润洗切片, 并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围多余的液体。

E. 用 PBS 将 Proteinase K 溶液稀释至终浓度为 20μg/mL, 每个样本上滴加 100μL 稀释后的 Proteinase K 溶液, 让溶液覆盖全部样本区域, 37℃ 孵育 15-30min (不同组织的最佳作用温度和时间需自行摸索)。

注: 不同组织或物种的样本反应时间可能不同。Proteinase K 通透时间过长可能会导致组织切片在后续步骤中从载玻片上脱落; 过短可能会导致通透处理不充分, 影响标记效率。建议进行预实验, 确定反应时间。

D. 用 PBS 溶液清洗 2-3 次, 每次室温放置 5min。

注: 务必要把 Proteinase K 清洗干净, 否则会严重干扰后续的标记反应。

3.2 阳性对照 (可选)

参考细胞涂片样本操作步骤。

3.3 标记及检测

参考细胞涂片样本操作步骤。

4、冰冻组织切片样本:

4.1 样本预处理

A. 将冰冻切片长置于长架上, 室温晾干 20min。

B. 将载玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液中, 室温固定 30min。

C. 轻轻去掉多余液体, 并用吸水纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。

D. 用 PBS 浸泡润洗切片 2 次, 每次 5min。用滤纸小心吸干载玻片上样本周围多余的液体。

E. 每个样本滴加每个样本上滴加 100μL 浓度为 0.2%的 Triton X-100 溶液, 使溶液覆盖全部样本区域, 室温孵育 15-30min。如果通透效果不好, 用 PBS 稀释 Proteinase K 溶液至其终浓度为 20μg/mL。每个样本滴加 100μL 稀释后的 Proteinase K 溶液, 让溶液覆盖全部样本区域, 37℃ 孵育 10-30min (不同组织的最佳作用温度和时间需自行摸索)。

注: 不同组织或物种的样本反应时间可能不同。Proteinase K 通透时间过长可能会导致组织切片在后续步骤中从载玻片上脱落; 过短可能会导致通透处理不充分, 影响标记效率。建

议进行预实验, 确定反应时间。

F. 用 PBS 溶液清洗 2-3 次, 每次室温放置 5min。用滤纸吸干样本周围液体。

注: 务必要把 Proteinase K 清洗干净, 否则会严重干扰后续的标记反应。

4.2 阳性对照 (可选)

参考细胞涂片样本操作步骤。

4.3 标记及检测

参考细胞涂片样本操作步骤。

四、注意事项

- 1、5 × 反应缓冲液含有表面活性剂, 所以在细胞涂片/切片样本的载玻片上滴加会扩散流失, 建议实验开始前用 Pan Pen 圈出染色区域。
- 2、5 × 反应缓冲液使用前, 室温静置至其完全溶解。冰冻的平衡液融化后可能会出现结晶, 此为正常现象, 使用前涡旋混匀。
- 3、Cy3-dUTP Mix 和 TdT Enzyme 应避免反复冻融和涡旋操作。Cy3-dUTP Mix 使用前, 请置于冰上溶解, 待完全溶解后离心, 用吸头吹打混匀。TdT Enzyme 对温度敏感, 请严格保存于 -20°C, 使用前取出, 使用后立即放回。
- 4、配制标记工作液和阳性对照 DNase I 时, 建议不要涡旋。
- 5、实验过程中请保持样本的湿润, 防止干片造成失败。
- 6、本说明书中的推荐条件是通用的, 用户可根据不同的样本类型和预实验的结果, 对样本处理时间、试剂浓度等条件进行优化, 选择合适的实验条件。

五、常见问题及解决方案

现象	可能原因	建议
非特异性染色	TdT 酶的浓度过高	用 TdT 反应缓冲液以 1:2-1:10 的比例进行稀释。
	TdT 酶反应时间过长或 TdT 酶标记过程中标记液渗漏, 细胞或组织表面不能保持湿润。	注意控制反应时间, 并确保 TdT 酶标记液能很好的覆盖样品。实验前用 PAP Pen 圈出染色区域
	光照紫外线导致包埋试剂的聚合 (如: 甲基丙烯酸会导致样本 DNA 的断裂)	尝试改用其他包埋材料或其他聚合试剂。
	在固定组织时样本 DNA 已断裂 (内源核酸酶的作用)。	确保样品取样后立即固定或通过肝静脉灌注固定。
	使用了不适当的固定液, 例如一些酸性固定液。	采用推荐的固定液。
	固定后某些核酸酶活性依然较高导致 DNA 断裂。	用含有 dUTP 和 dATP 的溶液封闭。
标记率低	如果以乙醇或甲醇固定的样本则标记效率较低 (因为在固定时染色质未能与蛋白质交联, 而在操作中丢失)。	用溶于 PBS pH7.4 中的 4% 多聚甲醛固定或福尔马林或戊二醛固定。

	固定时间过长, 导致交联成度过高。	减少固定时间, 或用溶于 PBS pH7.4 的 2%多聚甲醛固定。
	石蜡切片脱蜡不充分。	延长脱蜡时间, 或者更换新的脱蜡液。
	荧光淬灭。	注意避光操作。
	通透条件不佳, 以致于试剂不能达到靶分子或浓度过低。	增加通透时间; 或者优化 Proteinase K 的作用浓度和作用时间。
荧光背景高	支原体污染。	使用支原体检测试剂盒检测是否有支原体污染。
	非特异性标记。	在操作过程中保持细胞湿润; 标记反应完成, 载玻片再用 PBS 洗一遍之后, 可再用含 0.1% Triton X-100 和 5mg/mL BSA 的 PBS 洗 3 次, 每次 5min。
	红细胞中血红蛋白导致的自发荧光产生严重干扰。	可选择其它细胞凋亡检测试剂盒。
阳性对照无信号	DNase 1 工作液的浓度过低。	增加 DNase 1 工作液的浓度。
	通透时间不充分。	可通过调整 Proteinase K 或 Triton X-100 的孵育时间优化通透步骤。
	Proteinase K 洗涤不充分。	增加洗涤次数或延长洗涤时间。
	细胞样本中, 0.2% Triton X-100 没充分混匀。	提前 1-2 天配制 0.2%的 Triton X-100。
组织样本脱落	组织样本被酶从载玻片上消化下来。	1、降低 Proteinase K 的处理时间; 2、采用防脱载玻片, 如 TESPA 或者多聚赖氨酸包被载玻片, 阳离子处理载玻片, 切片专用防脱载玻片。