

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (FITC) 说明书

RC0171

保存条件

-20°C保存，避免反复冻融。

产品信息

产品名称	产品货号	规格
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (FITC)	RC0171M	20 次
	RC0171L	50 次

产品简介

细胞在发生凋亡时，会在生理生化和细胞形态上发生一系列变化，在凋亡中晚期，激活的 DNA 内切酶会切断核小体间的基因组 DNA，DNA 会被降解成为约 180bp-200bp 的片段，而正常或者增殖细胞很少发生 DNA 断裂。利用这个差异，用脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT 酶) 把 FITC 标记的 dUTP 标记到断裂 DNA 片段的 3' -OH 末端，然后进行荧光显微镜或流式细胞仪检测，这个方法被称为 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick- End Labeling)法细胞凋亡检测。

产品特色

- 采用的重组 TdT 突变体酶活性更高，该转移酶的比活是其他试剂盒里 TdT 活力的 10 倍，同样情况下，不被标记的 3' -OH 末端可以顺利标记上荧光，因此检测灵敏度更高；
- 试剂盒提供的 PI 核染料，可以将全部标记和未标记细胞的 DNA 着色，并在 488nm 波长激发光下发出红色荧光，从而得以判断凋亡细胞占总细胞比例；
- 产品使用方便，只需一步染色反应，染色完成后洗涤即可观察，约 1-2 个小时即可完成；
- 应用范围广，既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或悬浮细胞的凋亡情况。

产品内容

组成	保存
FITC-标记反应混合物 (FITC-LABELING REACTION MIX)	-20°C保存，避免反复冻融
TdT 酶 (TdT ENZYME)	
PI 染色液	

使用方法

一、石蜡包埋组织切片处理流程

A. 样本的脱蜡处理

- 1、室温下将石蜡组织切片放入二甲苯中浸泡 5 分钟。更换新的二甲苯再浸泡 5 分钟以彻底脱掉石蜡。
- 2、室温下用 100%乙醇浸泡切片 5 分钟，更换新的 100%乙醇再浸泡 5 分钟。
- 3、室温下用梯度乙醇(90、80、70%) 各浸洗 1 次，每次 2 分钟，逐渐增加水分。
- 4、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。

注意：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。

B. 增加样本的通透性

- 1、用 PBS 溶液配置终浓度为 20ug/ml 的蛋白酶 K(不含 DNase 活性)，每个样本需要 100uL 蛋白酶 K 溶液。
- 2、每个样本上滴加 100uL 浓度为 20ug/ml 的蛋白酶 K 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 20 分钟。

注意：严格控制孵育时间，孵育时间过长可对细胞造成一定的伤害，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。蛋白酶 K 工作液的使用浓度、处理时间及温度因组织或细胞的类型或固定方法的不同而有所不同，使用者可参照试剂盒提供的

标准使用说明摸索最合适的实验条件。

- 3、用 PBS 溶液润洗样本三次。
- 4、轻轻去掉多余液体，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样本的湿润。

C. 配制标记反应液:

组分比例	1 个样品	10 个样品	20 个样品
FITC-标记反应混合物	48 uL	480 uL	960 uL
TdT 酶 (25x)	2 uL	20 uL	40 uL
标记反应液	50 uL	500 uL	1000 uL

注意: 为了减少试剂损耗，在打开管盖前需短暂离心试管。标记反应液应充分混匀，并且一次用完，不能储存，所以应该酌量配置。

D. 标记反应

- 1、洗涤样品一次，轻轻吸干样本周围的缓冲液，注意不要触碰到样本。
- 2、在每个样本上立即滴加 50ul 上述准备的 TdT 标记反应混合物。
- 3、用预先裁剪好的比样本稍大的 Parafilm。封口膜覆盖样本。

注意: 可将封口膜折起一角以便于取放。封口膜的使用不仅可以确保反应混合物的均匀分布，也能减少孵育过程中的液体蒸发。

- 4、避光，将切片置于湿盒中于 37°C 孵育 60-90 分钟。

E. 终止与结果评断

- 1、移走 Parafilm。封口膜，并将切片置于 PBS 溶液中室温孵育 1 分钟。
- 2、轻轻去掉多余液体，换用新鲜的 PBS 溶液室温孵育 1 分钟。
- 3、用滤纸轻轻擦掉样本周围及背面的 PBS 溶液。

注意: 为了降低背景，载玻片在用 PBS 洗一遍之后，可再用含 0.1% TritonX-100 和 2mg/ml BSA 的 PBS 洗三次，每次 5 分钟，这样游离的未反应的标记物可以清除较干净。

- 4、滴加 50uL PI 染色液，在黑暗中室温放置 5 分钟
- 5、洗涤样本，将载玻片浸入去离子水中，室温放置 5 分钟。重复两次，总共洗三次。
- 6、滴干载玻片上多余的水并且用吸水纸擦拭细胞周边的区域。
- 7、立即在荧光显微镜下分析样本，用标准的荧光过滤装置在 $520 \pm 20\text{nm}$ 的荧光下观察绿色荧光，在 $>600\text{nm}$ 下观察 PI 的红色荧光。如有必要，载玻片能在 4°C 黑暗条件下存放过夜。

注意: PI 能将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色，只在凋亡的细胞核中才有 FITC-dUTP 掺入而定位的绿色荧光。

- 8、统计凋亡细胞数和细胞总数并计算出细胞凋亡率。

荧光显微镜检测

- PI 滤光片可以用来观察检测样本中的全体细胞，所有细胞都呈现红色荧光，FITC 滤光片观察样本，发出明亮绿色荧光信号的细胞为凋亡细胞，而暗淡或没有绿色荧光发出的区域则为未凋亡细胞或非凋亡晚期细胞。非凋亡细胞由于缺乏大量的 3'-OH 末端，因此不会被显著掺入和标记荧光素基团。
- 由于凋亡细胞中含有 3'-OH 末端的 DNA 片段主要集中在细胞核及凋亡小体中，因此可以利用形态学分析结合荧光信号来解释 TUNEL 法的凋亡检测的结果。凋亡过程中典型的形态学改变已经被明确确定和广泛接受，可以用来作为细胞程序化死亡的检测指标，并辅助说明 TUNEL 检测的实验结果。在组织切片样本中，很难观察到胞膜的突起或起泡，许多凋亡细胞的胞核呈现圆形或椭圆形，保存完好的凋亡小体有时可以观察到。由于凋亡是一个非同步发生的过程，组织中的凋亡细胞可能呈散在分布而非像坏死细胞一样呈连续或成群地分布。

二、组织冰冻切片处理流程

该操作流程与石蜡包埋组织切片相似，除了将脱蜡步骤替换为固定和短暂的水化步骤，并将蛋白酶 K 的处理时间缩短到 10 分钟。在进行该实验检测前需固定冰冻组织。为了避免在清洗步骤中的样本在玻片上损失，建议不用洗瓶清洗，而是将玻

片浸在 PBS 溶液中 2-3 次进行清洗。**注意：在操作中避免样本干燥！！**

A. 组织固定与水化

- 1、将玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液(溶于 PBS) 中，室温孵育 15 分钟。
- 2、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。
- 3、将玻片浸没在 PBS 溶液中，室温孵育 15 分钟。
- 4、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。这时可用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。

B. 增加样本通透性并将蛋白酶 K 的处理时间缩短到 10 分钟，其他同于(一、B)

C. D.E. 同于一

三、 固定细胞片处理流程

该操作流程与冰冻组织切片相似，除了将蛋白酶 K 的处理时间缩短到 5 分钟。将悬浮细胞固定到玻片上的操作 请参考" 注意事项" 章节。为了避免在清洗步骤中的样本在玻片上损失，建议不用洗瓶清洗，而是将玻片浸在 PBS 溶液中 2-3 次进行清洗。**注意：在操作中避免样本干燥！！**

四、流式细胞术检测细胞悬液处理流程

A. 细胞固定

- 1、4°C 缓慢离心(2000rpm) 5 分钟，去除培养上清，PBS 洗涤一次，重新离心收集细胞。
- 2、用新鲜配置 4%多聚甲醛(in PBS) 固定细胞，使其终密度为 1×10^6 /ml，室温孵育 10 分钟。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，离心收集细胞。按照上述方法 PBS 重悬洗涤一次，去除固定液并用 80%乙醇溶液以相同细胞密度重悬。

注意：固定后的细胞可以保存在 4°C，可以稳定保存 2-6 个月。

B. 水化

- 1、将 1ml 固定细胞(1×10^6 cells/ml) 转移到干净的离心管中。
- 2、室温缓慢离心(1000rpm) 5 分钟，去除乙醇溶液上清。
- 3、将细胞重悬在 200ul PBS 溶液中。
- 4、室温缓慢离心(1000rpm) 5 分钟，去除 PBS 溶液，重复一次。

C.增加细胞通透性

用含 0.1% Triton x-100 和 0.2%BSA 的 PBS 重悬细胞，室温孵育 5-10 分钟。

D1.设立阳性对照(可选)

- 1、DNaseI 溶液配置: 3000U/ml 或者 1mg/ml in PBS, 1mM MgSO₄ and 1mg/ml BSA
- 2、取经过预处理(已完成固定和通透性处理) 的细胞，用 DNaseI 处理，室温孵育 10 分钟。 D2. 设立阴性对照(可选) 在配置 E 中的标记反应液时，不加 TdT 酶。

E. 配制标记反应液:

组分比例	阴性对照	1 个样品	10 个样品	20 个样品
FITC-标记反应混合物	48uL	48 uL	480 uL	960 uL
TdT 酶 (25x)	0	2 uL	20 uL	40 uL
标记反应液	加水至 50uL	50 uL	500 uL	1000 uL

注意：为了减少试剂损耗，在打开管盖前需短暂离心试管。标记反应液应充分混匀，并且一次用完，不能储存，所以应该酌量配置。

F. 标记反应

- 1、PBS 洗涤样品一次。
- 2、在每个样本加入 50ul 上述准备的 TdT 标记反应混合物，重悬样品。
- 3、避光，将样品放置于 37°C 孵育 60 分钟。

G. 终止与结果评断

- 1、反应完成后,用 200uL PBS 洗涤 1 次。
- 2、滴加 50uL PI 染色液,在黑暗中室温放置 5 分钟。
- 3、离心,用 200uL PBS 洗涤样本,总共洗三次。
- 4、立即用流式细胞仪分析样本。

注意: PI 能将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色,只在凋亡的细胞核中才有 FITC-dUTP 掺入而定位的绿色荧光。

- 5、统计凋亡细胞数和细胞总数并计算出细胞凋亡率。

流式细胞仪检测:

- 用装备有 488nm 氩离子激发光源的流式细胞仪检测标记后的细胞悬液,发射波长是 517nm(FITC) 和 580(PI)。可以设定 FITC-PI 双染的细胞和 PI 单染的细胞比值作为凋亡细胞的比率。
- 流式细胞仪检测中光散射参数的改变同样可以用来监测和判断细胞凋亡情况的发生。例如,未处理的悬浮细胞大多有很高的前向散射值,但诱导出现凋亡后,由于细胞皱缩和膜起泡,侧向散射将大大增强。结合光散射参数的改变及 TUNEL 标记实验的检测结果,往往可以确定或互相印证用单个方法得到的结论。

注意事项

1. 为了避免试剂损失,使用前可以低速短暂离心融化后的试剂,然后小心开管取用;
2. 试剂盒使用后尽快放回-20°C冰箱保存;
3. TdT 酶在-20°C保存时不会凝固,不需要提前取出融化,只需在使用前迅速从-20°C冰箱中拿出取用后立即放回-20°C保存;
4. FITC-12-dUTP 标记混合液对光敏感,避光储存于 -20°C,在标记时,孵育缓冲液或者包含标记混合物的载玻片要避免光照;
5. 标记反应混合液包含二甲肿酸钾(potassium cacodylate),避免接触皮肤和眼睛,操作时戴好手套;
6. 如果用于石蜡切片的检测,需自备蛋白酶 K,二甲苯;
7. 用塑料或玻璃容器及纸巾自制湿盒,在样本处理过程中使用湿盒保持样本环境的湿润,一定避免样本干燥;
8. 固定样品,需自备多聚甲醛;
9. 悬浮细胞可用以下方法固定或贴附在玻片上:4°C缓慢离心(1000rpm) 5 分钟,去除细胞培养上清,并将细胞重新悬浮在 4%的甲醛溶液(溶于 1×PBS 溶液)使其终密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,室温孵育 10 分钟。按照上述方法离心收集细胞,去除固定液并用 80%乙醇溶液以相同细胞密度重悬。固定后的细胞可以保存在 4°C。固定后的细胞(100-300ul)可直接固定在玻片上,使用聚 L-赖氨酸包被的玻片可以提高细胞的黏附性。

常见问题

1. 非特异性荧光

- a. 有些细胞或组织,核酸或者聚合酶活性水平较高,导致出现非特异性的荧光标记。(建议:取细胞或组织后立即固定,以阻止这些酶导致假阳性。)
- b. TUNEL 反应时间过长,或细胞或组织表面不能保持湿润,也可能出现非特异性荧光。(建议:注意控制反应时间,并确保样品湿润。)

2. 荧光背景很高

- a. 支原体污染(建议:请使用支原体染色检测试剂盒检测是否为支原体污染。)
- b. 高速分裂和增值的细胞,有时也会出现细胞核中的 DNA 断裂,产生较多的 3'-OH 末端。(建议:凋亡晚期检测,同时减少 TUNEL 反应时间,以提高信噪比。)
- c. TUNEL 反应过强。(建议:减少 TdT 的用量至标准量的 20%-50%。)

3. 标记效率低

- a. 样品固定时间过长,导致交联程度过高。(建议:适当减少固定时间。)
- b. 荧光淬灭。Fluorescence 在普通光照 10 分钟就会严重淬灭。(建议:避光操作。)