

TUNEL FITC

Apoptosis Detection Kit



Vazyme Biotech Co., Ltd

网站/Web: www.vazyme.com

咨询热线/Tel: 400-600-9335

销售/Sales: sales@vazyme.com

技术支持/Support: support@vazyme.com

技术服务/Service: service@vazyme.com



www.vazyme.com

Vazyme biotech co., ltd.

使用说明书

Version 5.1

目录 Catalog

产品概要
产品组成
贮藏条件
实验方案
实验流程概览
样本预处理方案
DNA酶处理阳性对照的步骤 (可选的)
标记及检测
流式细胞术检测悬浮细胞的步骤
常见问题与解决方案
缓冲液及溶液组分

1/产品概要

背景介绍

细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象，在生物体进化、内环境的稳定以及系统发育中发挥着重要的作用。凋亡细胞在形态和生理生化方面会发生一些特征性的改变，比如细胞皱缩，细胞间连接消失，线粒体膜电位消失，通透性改变，核质浓缩，核膜核仁破碎，DNA降解成为约180 bp-200 bp的片段；胞膜有小泡状突起，膜内侧磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面，胞膜结构仍保持完整，最终凋亡细胞遗骸被分割包裹为几个凋亡小体，并迅速被周围专职或非专职吞噬细胞吞噬。以上改变发生在不同的细胞凋亡阶段。

细胞凋亡的一个显著特点是细胞染色体DNA的降解，这是一个较普遍的现象。这种降解非常特异并有规律，所产生的不同长度的DNA片段约为180 bp-200 bp的整数倍，而这正好是缠绕组蛋白DNA的长度，提示染色体DNA恰好是在核小体与核小体的连接部位被切断，产生不同长度的寡聚核小体片段。实验表明，这种DNA的有控降解是一种内源性核酸内切酶作用的结果，该酶在核小体连接部位切断染色体DNA，表现为琼脂糖凝胶电泳中呈现特异的梯状Ladder图谱，而坏死细胞的DNA呈弥漫的连续图谱。

检测原理

本试剂盒采用TUNEL (TdT mediated dUTP Nick End Labeling)法，应用末端脱氧核糖核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT)在凋亡细胞断裂DNA的3'-羟基(3'-OH)末端催化掺入荧光素-12-脱氧三磷酸尿苷(FITC-12-dUTP)。FITC-12-dUTP标记的DNA可以用荧光显微镜直接观察或者用流式细胞仪定量。试剂盒对标记反应进行了优化，采用最佳比例的荧光素标记和未标记dNTP进行3'-OH末端的核苷酸掺入，使得同一个断裂的DNA片段末端可以形成更长的“标记尾巴”，该“标记尾巴”减少了相邻掺入dNTP上标记基团的空间位阻，增加了每个断裂片段末端的荧光基团数目，降低了荧光基团相邻后可能造成的聚集和淬灭，从而提高检测灵敏度，减少非特异性反应。

2/产品组成

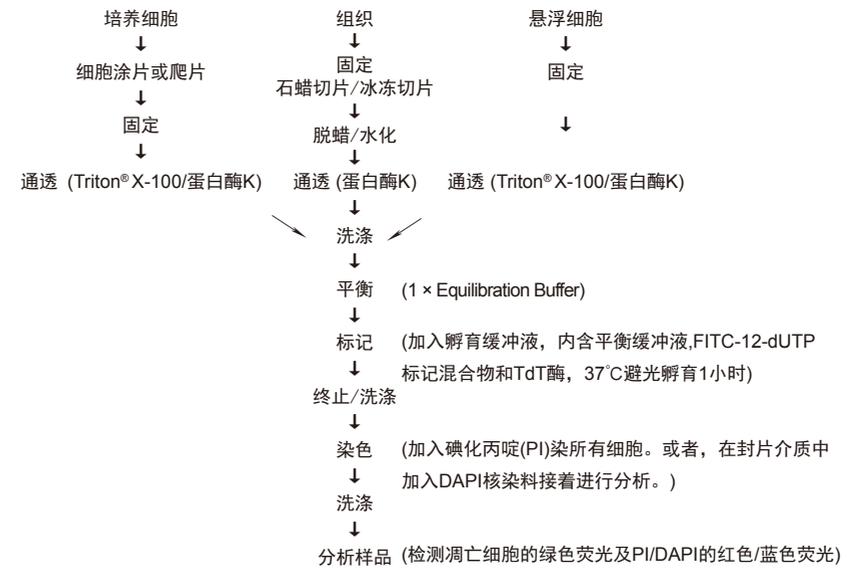
组 分	A111-01 (20 rxn)	A111-02 (50 rxn)	A111-03 (100 rxn)
5 × Equilibration Buffer	1.25 ml	1.25 ml × 2	1.25 ml × 3
FITC-12-dUTP Labeling Mix	100 μl	250 μl	250 μl × 2
Recombinant TdT Enzyme	20 μl	50 μl	50 μl × 2
Proteinase K (2 mg/ml)	40 μl	100 μl	100 μl × 2
DNase I (1 U/μl)	5 μl	13 μl	25 μl
10 × DNase I Buffer	100 μl	260 μl	500 μl

3/贮藏条件

本产品应置于-20℃储存；FITC-12-dUTP Labeling Mix避光储存于-20℃。

4/实验方案

4.1 实验流程概览



图一：实验流程概览

4.2 样本预处理方案

A. 石蜡包埋组织切片

- 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。
- 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。
- 室温下用梯度乙醇(90、80、70%)各浸洗1次，每次3分钟，逐渐增加水分。
- 用PBS浸泡润洗切片，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，便于下游通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湿润。
- 按1:100的比例，用PBS稀释2 mg/ml的Proteinase K溶液，使其终浓度为20 μg/ml。每个样本需要100 μl Proteinase K溶液。
- 每个样本上滴加100 μl浓度为20 μg/ml的Proteinase K溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育20分钟。

注意：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玻片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到最好的结果，可能需要优化Proteinase K孵育的时间。

- 用PBS溶液润洗样本2-3次。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湿润。

B. 组织冰冻切片

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短暂的回温步骤，并将Proteinase K的处理时间缩短到10分钟。冰冻组织在进行实验之前应先固定。为了避免在清洗步骤中的样本脱片损失，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！

1. 将玻片浸没在4%多聚甲醛溶液(溶于PBS)中，室温孵育30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。重复用PBS洗一次，共洗两次。
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。这时可用石蜡笔或指甲油在样品周围描绘轮廓，便于下游通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湿润。
5. 按1:100的比例，用PBS稀释2 mg/ml的Proteinase K溶液，使其终浓度为20 $\mu\text{g/ml}$ 。每个样本需要100 μl Proteinase K溶液。
6. 每个样本上滴加100 μl 浓度为20 $\mu\text{g/ml}$ 的Proteinase K溶液，使其覆盖全部样本区域，室温孵育10分钟。

注意：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玻片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到最好的结果，可能需要优化Proteinase K孵育的时间。

7. 在盛有PBS溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本2-3次。
8. 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湿润。

C. 细胞样品

细胞爬片的准备：

在Lab-Tek®载玻片小室(Chamber Slides)上培养贴壁细胞。在凋亡诱导处理之后，用PBS漂洗载玻片2次。进入后续实验。

细胞涂片的准备：

多聚赖氨酸包被的载玻片的准备：吸取50–100 μl 0.01% (W/V)多聚赖氨酸水溶液(Sigma Cat.# P9155或Sigma Cat.# P8920, 1:10用水稀释)滴至每一片预清洗过的玻璃载玻片的表面。在将要用于固定细胞的区域将多聚赖氨酸溶液涂散为一薄层。待载玻片晾干之后，迅速用去离子水漂洗，然后让包被后的载玻片在空气中晾干30-60分钟。包被后的载玻片能在室温储存数月。

以大概 2×10^7 个细胞/ml的浓度将细胞重悬在PBS中。吸50–100 μl 细胞悬液滴于多聚赖氨酸包被的载玻片上。用一片干净的载玻片轻柔地涂开细胞悬液，进入后续实验。

1. 固定细胞，将载玻片浸入装有4%多聚甲醛(新鲜配制于PBS)的染色缸中，在4°C放置25分钟。
2. 洗涤载玻片，将其浸入PBS中，室温放置5分钟。重复用PBS洗一次。
3. 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。可用石蜡笔或指甲油在样品周围描绘样品分布的轮廓，便于下游通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湿润。

4. 按1:100的比例，用PBS作为稀释液来稀释2 mg/ml的Proteinase K溶液，使其终浓度为20 $\mu\text{g/ml}$ 。每个样本需要100 μl Proteinase K溶液。

5. 每个样本上滴加100 μl 浓度为20 $\mu\text{g/ml}$ 的Proteinase K溶液，使溶液全部样本区域，室温孵育5分钟(也可浸于0.2%配制于PBS中的Triton® X-100溶液中，室温孵育5分钟进行通透处理)。

注意：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玻片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到最好的结果，可能需要优化Proteinase K孵育的时间。

6. 在盛有PBS溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本2-3次。

7. 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湿润。

4.2.1 DNA酶处理阳性对照的步骤(可选)

检测DNA断裂的阳性对照按照以下所述进行。在样本通透处理之后，用DNase I处理细胞来准备阳性对照载玻片。

注意：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。下面叙述的流程通常会引起被处理的大多数细胞显现绿色荧光。

1. 按1:10的比例用去离子水稀释 $10 \times$ DNase I Buffer(每个样本需用20 μl $10 \times$ DNase I Buffer和180 μl 去离子水混合稀释成200 μl $1 \times$ DNase I Buffer)，滴加100 μl 到已通透的样本上，室温孵育5分钟。向剩余100 μl $1 \times$ DNase I Buffer中加1 μl DNase I (1 U/ μl)，使其终浓度为10 U/ml。
2. 轻轻叩掉液体，加入100 μl 含10 U/ml DNase I的缓冲液，室温孵育10分钟。
3. 轻叩载玻片，去掉多余的液体，并将载玻片在装有去离子水的染色缸中彻底洗3-4次。

注意：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的背景。

4.3 标记及检测

1. 按1: 5的比例用去离子水稀释 $5 \times$ Equilibration Buffer(每个样本需用20 μl $5 \times$ Equilibration Buffer和80 μl 去离子水混合稀释成100 μl $1 \times$ Equilibration Buffer)。
2. 滴加100 μl $1 \times$ Equilibration Buffer使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育10-30分钟。或者将载玻片放入一个含有 $1 \times$ Equilibration Buffer的缸中，保证缓冲液没过样本。在平衡细胞的同时在冰上解冻FITC-12-dUTP Labeling Mix，并且依照表1，准备足够量的用于所有实验的和可选阳性对照反应的TdT孵育缓冲液。对于面积小于5 cm^2 的一个标准反应，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TdT孵育缓冲液的总体积。对于表面积更大的样本，可成比例的增大试剂体积。

组 分	体 积 (μl / 50 μl 体系)	样 本 数 目 (实验反应+ 可选阳性对照)	总 体 积 (μl)
ddH ₂ O	34		
$5 \times$ Equilibration Buffer	10		
FITC-12-dUTP Labeling Mix	5		
Recombinant TdT Enzyme	1		

表1. 准备用于实验的和可选阳性对照反应的TdT孵育缓冲液
适用于阴性对照：准备一份不含TdT酶的对照孵育缓冲液，用ddH₂O替代TdT酶。

3.在平衡后的区域周围用吸水纸吸掉100 μ l Equilibration Buffer中的大部分，然后在5 cm^2 面积的细胞上加上50 μ l TdT孵育缓冲液。不要让细胞干掉。

4.将封口膜剪成与组织或爬片同等大小，轻盖在样本上以保证试剂的平均分布。在湿盒的底部放上用水浸湿的纸巾。将载玻片置于湿盒内，37 $^{\circ}$ C孵育60分钟。将湿盒用铝箔纸包裹以避免光照。

注意：可折起封口膜的边缘以便于移除和操作。在第3步完成之后，载玻片要避免光。

5.移除封口膜，并将切片置于PBS溶液中室温孵育5分钟。

6.轻轻去掉多余液体，换用新鲜的PBS溶液室温孵育5分钟。重复该步骤1次。

7.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% Triton $^{\circ}$ X-100和5 mg/ml BSA的PBS洗三次，每次5分钟，这样可将游离的未反应标记物清除干净。

8.样本在染色缸中染色，在黑暗中将载玻片浸入装有PI溶液的染色缸，室温放置5分钟，此处PI溶液是用PBS新鲜配制并稀释到1 μ g/ml的。可选操作：样本在染色缸中染色，在黑暗中将载玻片浸入装有DAPI溶液的染色缸，室温放置5分钟，此处DAPI溶液是用PBS新鲜配制并稀释到2 μ g/ml的。

9.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。

10.擦干载玻片上多余的水，并向样本区域加100 μ l PBS保持样本湿润。

11.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 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。如有必要，载玻片能在4 $^{\circ}$ C黑暗条件下存放过夜。

注意：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掺入而产生的绿色荧光。

4.4 流式细胞术检测悬浮细胞的步骤

1.将3–5 \times 10 6 个细胞用PBS洗两次，每次4 $^{\circ}$ C 300 g离心10分钟。然后重悬于0.5 ml PBS中。

2.固定细胞：加入5 ml 1%配制于PBS中的多聚甲醛溶液，冰上放置20分钟。

3.细胞在4 $^{\circ}$ C 300 g离心10分钟，去上清并且重悬于5 ml PBS。重复洗一次并把细胞重悬于0.5 ml PBS中。

4.通透细胞：加入5 ml冰上预冷的70%乙醇，在-20 $^{\circ}$ C 孵育4小时。细胞能在70%乙醇中-20 $^{\circ}$ C的条件下保存一周。或者，细胞可用配制于PBS中的0.2% Triton $^{\circ}$ X-100溶液通透，室温放置5分钟。

5.300 g离心10分钟，弃上清，细胞重悬于5 ml PBS。重复离心并把细胞重悬于1 ml PBS中。

6.转移2 \times 10 6 个细胞至一个1.5 ml的微量离心管。

7.300 g离心10分钟，去上清并把沉淀重悬在80 μ l 1 \times Equilibration Buffer (按1: 5的比例用去离子水稀释5 \times Equilibration Buffer)中。室温孵育5分钟。

8.在平衡细胞的同时，冰上融解FITC-12-dUTP标记混合物，并且依照表1准备足够量的用于所有反应的TdT孵育缓冲液。对于2 \times 10 6 个细胞的一个标准反应，所需体积是50 μ l。用50 μ l乘上反应数目来确定所需TdT孵育缓冲液的总体积。

9.细胞在300 g离心10分钟，去上清并把沉淀重悬在50 μ l TdT孵育缓冲液中。37 $^{\circ}$ C孵育60分钟，避免光照。每隔15分钟用微量移液器轻轻重悬细胞。

10.加入1 ml 20 mM EDTA终止反应。用微量移液器轻柔混匀。

11.300 g离心10分钟，去上清，细胞重悬于1 ml配制于PBS中的0.1% Triton $^{\circ}$ X-100，其中含5 mg/ml BSA。重复一次，总共洗两次。

12.300 g离心10分钟，去上清，细胞重悬于0.5 ml用PBS新鲜配制的5 μ g/ml PI溶液中，其中包含250 μ g无DNA酶的RNA酶A。

13.在黑暗中室温孵育细胞30分钟。

14.用流式细胞仪分析细胞。测量520 \pm 20 nm的FITC-12-dUTP的绿色荧光和>620 nm的PI的红色荧光。

注意：PI将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色。只有凋亡的细胞核中有FITC-12-dUTP掺入而产生的绿色荧光。

5/常见问题与解决方案

Q. 高背景 (如，未凋亡细胞的强绿色荧光背景)

A. 非特异性掺入FITC-12-dUTP。在操作过程中保持细胞湿润；标记反应完成，载玻片在用PBS洗一遍之后，可再用含0.1% Triton $^{\circ}$ X-100和5 mg/ml BSA的PBS洗三次，每次5分钟。

Q. 荧光信号弱

A. 蛋白酶K或Triton $^{\circ}$ X-100的通透不充分。通过调整通透剂的孵育时间优化通透步骤。

Q. 组织切片从载玻片上脱落

A. 组织切片粘附之前的包被不充分。在展片之前，用3-氨丙基三乙氧基硅烷 (3-aminopropyl triethoxysilane, TESPA; Sigma Cat.# A3648)包被显微镜载玻片比多聚赖氨酸 (poly-L-lysine)效果更好。

Q. 最后显微镜或流式细胞仪分析只剩下很少的细胞

A. 在操作过程中丢失大量细胞：

提高起始的细胞量；

在制备贴到显微镜载玻片的细胞悬液时，离心过程中用含1%BSA的PBS洗细胞；

在制备细胞悬液时，离心过程中用含1%BSA的PBS洗细胞。

6/缓冲液及溶液组分

1 × PBS (pH 7.4):

137 mM NaCl

2.68 mM KCl

1.47 mM KH_2PO_4

8.1 mM Na_2HPO_4

PI 溶液 (1 mg/ml):

称取10 mg PI溶于10 ml PBS中。0-4°C避光储存。使用时适量稀释。

DAPI 溶液 (1 mg/ml):

称取10 mg DAPI溶于10 ml PBS中。0-4°C避光储存。使用时适量稀释。

DNA酶I (DNase I)缓冲液:

40 mM Tris-HCl (pH 7.9)

10 mM NaCl

6 mM MgCl_2

10 mM CaCl_2

1%甲醛溶液:

将6.25 ml 16%不含甲醇的甲醛混入90 ml PBS。加几滴1N NaOH, 混匀并调节pH值至7.4。

用PBS定容至100 ml。每次使用前新鲜配制。

4%甲醛溶液:

将25 ml 16%不含甲醇的甲醛混入70 ml PBS。加几滴1N NaOH, 混匀并调节pH值至7.4。

用PBS定容至100 ml。每次使用前新鲜配制。

4%多聚甲醛溶液:

在通风橱中称取4 g多聚甲醛, 加PBS至100 ml。装于密闭容器中在65°C水浴加热溶解2小时。

4°C储存溶液, 在4°C至少可稳定储存两周。

10% Triton® X-100溶液:

在烧杯中混合85 ml高压灭菌去离子水和10 ml Triton® X-100溶液, 磁力搅拌混匀。用水定

容至100 ml。