

## TUNEL Apoptosis Detection Kit (FITC)

## TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (FITC)

### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
	40306ES20	20 T
TUNEL Apoptosis Detection Kit (FITC) TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (FITC)	40306ES50	50 T
	40306ES60	100 T

### 产品描述

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。细胞凋亡时抽提 DNA 进行电泳检测，可以发现 180-200 bp 的 DNA ladder。

TUNEL (TdT mediated dUTP Nick End Labeling) 细胞凋亡检测试剂盒 (FITC) 可以用来检测组织细胞在凋亡晚期过程中细胞核 DNA 的断裂情况。其原理是在末端脱氧核糖核苷酸转移酶 (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 的作用下，在基因组 DNA 断裂时暴露出的 3'-羟基 (3'-OH) 末端掺入 FITC-12-dUTP，从而可以用荧光显微镜或流式细胞仪检测。

本试剂盒对标记反应进行了优化，采用最佳比例的 FITC-12-dUTP 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，增加每个断裂片段上的荧光基团数目，降低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。

本试剂盒应用范围广，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。

### 产品组分

编号	组分	产品编号/规格		
		40306ES20 (20T)	40306ES50 (50T)	40306ES60 (100T)
40306-A	5×Equilibration Buffer	750 μL	1.25 mL×2	1.25 mL×3
40306-B	FITC-12-dUTP Labeling Mix	100 μL	250 μL	250 μL×2
40306-C	Recombinant TdT Enzyme	20 μL	50 μL	50 μL×2
40306-D	Proteinase K (2 mg/mL)	40 μL	100 μL	100 μL×2
40306-E	DNase I (1 U/μL)	5 μL	12.5 μL	25 μL
40306-F	10 × DNase I Buffer	100 μL	250 μL	500 μL

### 运输与保存方法

冰袋 (wet ice) 运输。

本试剂盒储存在 -20°C，FITC-12-dUTP Labling Mix 避光储存于 -20°C，保质期为二年。

### 注意事项

- 1) 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。
- 2) 如需染核，需自备 DAPI (2 μg/mL) 或 PI (1 μg/mL)。
- 3) 如果用流式细胞仪，自备 PI (1 μg/mL) 和 DNase Free RNase A。
- 4) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 5) 本产品仅作科研用途！

## 操作步骤

### 一、样品准备

#### A. 石蜡包埋组织切片

1. 室温下将石蜡组织切片放入二甲苯中浸泡 5 min，重复一次，以彻底脱掉石蜡。
2. 室温下用 100%乙醇浸泡切片 5 min，重复一次。
3. 室温下用梯度乙醇（90、80、70%）各浸洗 1 次，每次 3 min。
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。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。
5. 配制 Proteinase K 工作液：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  $\mu\text{g/mL}$ 。
6. 每个样本上滴加 100  $\mu\text{L}$  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。未得到更好的结果，可能需要优化 Proteinase K 孵育的时间。

7. 用 PBS 溶液润洗样本，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。处理后的样本放在湿盒中保存样本的湿润。

#### B. 组织冰冻切片

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 15 min。
2. 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。
3. 将玻片浸没在 PBS 溶液中，室温孵育 15 min。
4. 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。
5. 配制 Proteinase K 工作液：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  $\mu\text{g/mL}$ 。
6. 每个样本上滴加 100  $\mu\text{L}$  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。

7. 用 PBS 溶液润洗样本 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。处理后的样本放在湿盒中保存样本的湿润。

#### 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 洗 2 遍载玻片。

##### 【细胞涂片的制备（以多聚赖氨酸包被的载玻片为例）】

1. 准备多聚赖氨酸包被的载玻片：吸取 50–100  $\mu\text{L}$  0.01% (w/v) 多聚赖氨酸水溶液，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 min。包被后的载玻片能在室温储存数月。
2. 以约  $2 \times 10^7$  个细胞/mL 的浓度将细胞重悬于 PBS 中，吸取 50-100  $\mu\text{L}$  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的涂开细胞悬液。

按照以下步骤对细胞样品进行处理：

1. 固定细胞，将载玻片浸入装有 4%新鲜配制于 PBS 中的多聚甲醛的染色缸中，在 4 $^{\circ}\text{C}$  放置 25 min。
2. 洗涤载玻片，将其浸入 PBS 中，室温放置 5 min。重复用 PBS 洗一次。
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，可用石蜡笔或指甲油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. 每个样本上可浸于 0.2%配制于 PBS 中的 Triton X-100 溶液中，室温孵育 5 min 进行通透处理（Proteinase K 处理容易使细

胞脱落)。

5. 在盛有 PBS 溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本 2-3 次。
6. 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。处理后的样本放在湿盒中保存样本的湿润。

## 二、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 处理细胞来准备阳性对照载玻片。该流程通常会引起被处理的大多数细胞显现绿色荧光。

**【注】:** DNA 酶 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。

1. 按 1:10 的比例用去离子水稀释 10×DNase I Buffer(每个样本需用 200 μL 1×DNase I Buffer, 即需要用 20 μL 10×DNase I Buffer 和 180 μL 去离子水混合稀释), 取其中 100 μL 滴加到已通透的样本上, 室温孵育 5 min。向剩余 100 μL 1×DNase I Buffer 中加 1 μL DNase I (1U/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 min。
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】:** 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。

## 三、标记与检测

1. 按 1:5 的比例用去离子水稀释 5×Equilibration Buffer。
2. 每个样本滴加 100 μL 1×Equilibration Buffer 使其全部覆盖待检样本区域, 室温孵育 10-30 min。或者将载玻片放入一个含有 1×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 Labling 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<sup>2</sup> 的一个标准反应, 其体积是 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。

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

组分	体积 (μL / 50 μL 体系)
ddH <sub>2</sub> O	34
5×Equilibration Buffer	10
FITC-12-dUTP Labling Mix	5
Recombinant TdT Enzyme	1

阴性对照体系: 准备一份不含 TdT 酶的对照孵育缓冲液, 用 ddH<sub>2</sub>O 替代 TdT 酶。

3. 在平衡后的区域周围用吸水纸洗掉 100 μL 1×Equilibration Buffer 中的大部分, 然后在 5 cm<sup>2</sup> 面积的细胞上加入 50 μL TdT 孵育缓冲液。不要让细胞干掉。**这之后的操作, 载玻片要避光。**
4. 把塑料盖玻片盖在细胞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, 在 37°C 孵育 60 min。将湿盒用铝箔纸包裹以避光。

**注:** 塑料盖玻片在使用前可以切成两半。折起盖玻片的边缘以便于移除和操作。

5. 移除塑料盖玻片, 并将切片置于 PBS 溶液中室温孵育 5 min。
6. 轻轻去掉多余液体, 换用新鲜的 PBS 溶液室温孵育 5 min, 重复一次。
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 洗一遍后, 可再用含 0.1% Triton X-100 和 5 mg/mL BSA 的 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 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 (1 μg/mL, 用 PBS 新鲜配制并稀释) 的染色缸, 室温放置 5 min。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 (2 μg/mL, 用 PBS 新鲜配制并稀释) 的染色缸, 室温放置 5 min。
9. 洗涤样本, 将载玻片浸入去离子水中, 室温放置 5 min, 重复 2 次, 总共洗 3 次。
10. 叩干载玻片上多余的水并且用吸水纸擦拭细胞周边的区域。
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±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°C 黑暗条件下存放过夜。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。

## 四、利用流式细胞术检测悬浮细胞

1. 将 3-5×10<sup>6</sup> 个细胞用 PBS 在 4°C 离心 (300×g) 洗两次, 然后重悬在 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 min。
3. 细胞在 4°C，300×g 离心 10 min，去上清并且重悬于 5 mL PBS。重复洗一次，并用 0.5 mL PBS 重悬细胞。
4. 通透细胞，加入 5 mL 冰上预冷的 70% 乙醇，在 -20°C 孵育 4 小时。细胞能在 70% 乙醇中 -20°C 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 5 min。
5. 细胞在 300×g 离心 10 min，并用 5 mL PBS 重悬。重复离心，并 1 mL PBS 重悬。
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 min，去上清，并用 80  $\mu$ L 1×Equilibration Buffer 重悬。室温孵育 5 min。
8. 在平衡细胞的同时，在冰上融解 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，其体积是 50  $\mu$ L，用 50  $\mu$ 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 min，去上清并把沉淀重悬在 50  $\mu$ L TdT 孵育缓冲液中，37°C 孵育 60 min，避光。每隔 15 min 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 min，去上清并把沉淀重悬在 1 mL 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。
12. 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  $\mu$ g/mL）中，其中包含 250  $\mu$ g 无 DNA 酶的 Rnase A。
13. 在黑暗中室温孵育细胞 30 min。
14. 用流式细胞仪分析细胞，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。