

# 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

货号：PMK0997

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：20T/50T/100T

适用样本：贴壁细胞，悬浮细胞，石蜡包埋组织切片，冰冻切片

应用实验：适用细胞及组织样本的流式细胞术、荧光检测等实验

## 产品简介

细胞凋亡中，基因组 DNA 断裂时产生大量的粘性 3'-OH 末端，可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 的催化下，将脱氧尿苷三磷酸核苷酸 (dUTP) 和荧光素形成的衍生物标记到 DNA 暴露的 3'-OH 末端，从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行凋亡细胞的检测，这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal -deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂，因而没有 3'-OH 形成，很少能够被染色。由此，TUNEL 成为了检测 DNA 片段化（细胞凋亡）的最常用方法。本试剂盒荧光信号检测通道为 FITC 通道 (Ex/Em=490nm/520nm)。

## 产品内容

试剂盒组分	规格			储存条件
	20T	50T	100T	
TdT 酶	40 μL	100 μL	200 μL	-20℃
平衡缓冲液 (5×)	0.4mL	1mL	2mL	-20℃
绿色荧光标记物	100 μL	250 μL	500 μL	-20℃，避光保存
DAPI (500×)	8 μL	20 μL	40 μL	-20℃，避光保存
洗液	6mL	15mL	30mL	-20℃
Triton X-100 (通透剂)	100 μL	250 μL	500 μL	4℃
4%多聚甲醛	20mL	50mL	100mL	-20℃，避光保存
DNase I (5U/μL)	4 μL	10 μL	10 μL	-20℃
DNase I 稀释液 (10×)	0.3mL	0.6mL	0.6mL	-20℃
蛋白酶 K (20mg/ml)	4 μL	10 μL	20 μL	-20℃

## 自备仪器耗材

离心机，荧光显微镜或流式细胞仪

96 孔细胞板，可调节式移液枪及枪头

磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4)，去离子水

二甲苯、乙醇、抗荧光淬灭剂、组织自发荧光淬灭剂 如碧云天 货号：P0122（如果是组织样本）

## 试剂准备

**注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。**

1×DAPI：根据实际用量，用 PBS 将 DAPI (500×) 稀释成 1×DAPI。

TritonX-100 (0.3%)：根据实际用量，用 PBS 将 TritonX-100 稀释成 0.3% TritonX-100。

## 产品说明书

4%多聚甲醛：根据每次的使用量分装，-20℃，避光保存。每次取出一管，避免反复冻融。

1×平衡缓冲液：根据实际用量，用去离子水将 5×平衡缓冲液 稀释成 1×平衡缓冲液。

1×DNase I 稀释液：根据实际用量，用去离子水将 10×DNase I 稀释液稀释成 1×DNase I 稀释液。（选做）

10U/mL DNase I：根据实际用量，按 1:500 的比例用 1×DNase I 稀释液将 5U/μL DNase I 稀释成 10U/mL DNase I。（选做）

### 对照设置

阴性对照：用于排除细胞本底、药物处理等原因产生荧光背景、组织自发荧光以及非特异性染色造成的影响。准备一组细胞作为阴性对照，在步骤 B.1 配制 TdT 标记反应缓冲液时不添加 TdT 酶，其余操作与实验组相同。阳性对照（选做）

如需设置阳性对照，可在样本制备已完成通透的样本上滴加 100μL 10U/mL DNase I，室温孵育 10-20min，样本用 PBS 浸洗 3 次，每次 5min，然后再进行荧光显微镜分析。如果是组织切片，建议阳性对照后续操作在单独的染色缸中染色和洗涤。

### 实验步骤

#### A. 样本制备

1. 对于贴壁细胞（通过荧光显微镜分析）

- (1) 在 96 孔板进行细胞培养，至少 24h。通过所需方法诱导细胞凋亡，同时培养无诱导的对照组细胞。
- (2) 除去培养基，在室温下用 50μL 4%多聚甲醛固定细胞 30min。
- (3) 除去固定液并用 200μL PBS 浸洗 3 次，每次 5min。
- (4) 固定后，每孔添加 50μL 0.3%Triton X-100，并在室温下孵育 30min。
- (5) 除去通透剂并用 200μL PBS 浸洗样品 3 次，每次 5min。进行荧光显微镜分析（继续进行步骤 B.1）。

**注意：对于细胞爬片及其他孔板细胞，可依据实际情况调整固定液和通透剂体积。**

2. 对于非贴壁细胞（通过流式细胞仪分析）

- (1) 培养细胞至最佳密度（约  $1-2 \times 10^6$  细胞/mL），通过所需方法诱导细胞凋亡，同时培养无诱导的对照培养物。
- (2) 以 300g 离心并收集细胞（ $1-5 \times 10^6$ ），用 PBS 洗涤 2 次。
- (3) 加入 1mL 4%多聚甲醛，在室温下孵育 30min。
- (4) 以 300g 离心细胞，除去上清液，重悬于 1mL PBS 中，重复洗涤 2 次。
- (5) 以 300g 离心细胞，除去上清液，在室温下，用 500μL 0.3% Triton X-100 重悬细胞 5min 使其通透（或者将细胞在 100μg/mL 蛋白酶 K 的 PBS 中重悬 5min 使其通透）。
- (6) 以 300g 离心细胞，除去上清液，重悬于 1mL PBS 中。重复洗涤 2 次，然后进行流式细胞仪分析（继续进行步骤 B.2）。

3. 对于石蜡包埋的组织切片（通过荧光显微镜分析）

- (1) 将组织在二甲苯浸泡 2 次，每次 10-20min 进行脱蜡。
- (2) 通过以下步骤为组织复性：在 100%乙醇中 2 次洗涤 5min，然后依次在 95%，70%和 50%乙醇中洗涤 3min。

**注意：也可按自己实验室组织脱蜡、复性步骤进行操作。**

- (3) 用适量的 PBS 浸洗样品 2 次，每次 5min。
- (4) 去除组织中多余的 PBS，切片稍甩干后，用组画笔在组织周围画圈，并在 20μg/mL 蛋白酶 K（在 PBS 中，现配现用）溶液中室温孵育 10min 左右。100 μL-200 μL 蛋白酶 K 溶液，覆盖组织即可。

**注意：必须针对特定组织类型和厚度优化蛋白酶消化时间。蛋白酶过度消化将导致细胞结构丧失，组织切片可能会从玻片上脱落。消化不充分会导致 TdT 标记不彻底。**

- (5) 用适量的 PBS 浸洗样品 3 次，每次 5min 来终止蛋白酶消化作用，进行荧光显微镜分析（继续进行步骤 B.1）。

4. 对于冰冻组织切片（通过荧光显微镜分析）

- (1) 将切片在玻片上干燥后，在室温下用 200μL 4%多聚甲醛固定 30min。
- (2) 用适量的 PBS 浸洗 2 次，每次 5min。
- (3) 去除组织中多余的 PBS，切片稍甩干后，用组画笔在组织周围画圈，并在 20μg/mL 蛋白酶 K（在 PBS 中，现配现用）溶液中室温孵育 10min 左右。100 μL-200 μL 蛋白酶 K 溶液，覆盖组织即可。
- (4) 用适量的 PBS 浸洗样品 3 次，每次 5min 来终止蛋白酶消化作用，进行荧光显微镜分析（继续进行步骤 B.1）。

## 产品说明书

**注意：**必须针对特定组织类型和厚度优化蛋白酶消化时间。蛋白酶过度消化将导致细胞结构丧失，组织切片可能会从玻片上脱落。消化不充分会导致 TdT 标记不彻底。

### B. TUNEL 分析

#### 1. 荧光显微镜分析

(1) 根据要分析的样品数量，在使用前准备 TdT 标记反应缓冲液：

组分	每孔体积 (μL)
TdT 酶	2
平衡缓冲液 (5×)	10
绿色荧光标记物	5
去离子水	33
总体积	50

**注意：**配制 TdT 标记反应缓冲液之前，将各组分平衡至室温，平衡缓冲液 (5×) 母液因低温保存，会出现少量成分析出的现象，请颠倒混匀后使用。平衡缓冲液 (5×) 具有一定毒性，皮肤接触后，立即用大量水冲洗。

(2) 向每个样品中加入 50μL (96 孔板推荐 50μL, 24 孔板推荐 200μL, 切片建议添加 100-200μL 盖住组织即可) 1×平衡缓冲液，室温避光孵育 5min。

(3) 弃去 1×平衡缓冲液，向每个样品中加入 50μL (96 孔板推荐 50μL, 24 孔板推荐 200μL, 切片建议添加 100-200μL 盖住组织即可) TdT 标记反应缓冲液，并在湿盒中 37℃ 下避光孵育 2h (不同的样本，可视情况调整孵育时间)。

**注意：**湿盒底部需加入适量超纯水以在孵育过程中保持湿润，减少 TdT 标记反应缓冲液挥发。

(4) 用 PBS 将样品浸洗 2 次，每次 5min，再用洗液清洗 3 次，每次 5min，以降低背景。

(5) 用 1×DAPI 孵育 10min 对样品进行复染。

**注意：**如需计算凋亡细胞比例，建议复染，根据染色组织的不同，复染浓度可能需要调整。DAPI 过度染色可能导致难以观察荧光素标记。

(6) 用适量的 PBS 浸洗样品 3 次，每次 5min。

(7) 组织自发荧光淬灭 (选做)，对于组织样本，可添加组织自发荧光淬灭剂室温避光孵育 5 min，去离子水浸洗 5min 后 PBS 浸洗 3 次，每次 5 min。

**注意：**1. 组织切片会产生一定的自发荧光，可通过阴性对照来评估组织自发荧光水平。如自发荧光水平较高，进行组织自发荧光淬灭操作 (仅组织样本需要淬灭自发荧光)，组织自发荧光淬灭剂处理后组织会染成蓝色，也会一定程度降低 Tunel 的荧光强度，但不影响荧光显微镜拍照；

2. 需精确组织自发荧光淬灭剂的孵育时间，可在第一个样本添加组织自发荧光淬灭剂后开始计时 5 min；

3. 组织自发荧光淬灭剂易挥发，在孵育过程中，需要及时补添，以免试剂变干凝固结块，影响后续拍照观察。

(8) 对于细胞爬片、石蜡切片和冰冻切片等样本，可加入水性封固剂或抗荧光淬灭剂，封住盖玻片，用荧光显微镜进行观察。对于孔板、培养皿内细胞样本，加入适量 PBS 浸没细胞，再进行荧光显微镜拍照观察。红色通道 (Ex/Em=555nm/565nm)。

#### 2. 流式细胞仪分析

(1) 将细胞重悬于 100μL 1×平衡缓冲液中，在室温下避光孵育 10min。

(2) 300g 离心细胞，除去上清液，重悬于 50μL TdT 标记反应缓冲液中，在 37℃ 下孵育 2h (不同的样本，可视情况调整孵育时间)，孵育期间可定时轻轻地晃动以混匀细胞。

(3) 300g 离心细胞。除去上清液，重悬于 1mL PBS 中。重复洗涤 2 次。

(4) 重悬于 200μL 1×DAPI 中，孵育 10min。

(5) 通过流式细胞仪分析细胞。

#### 相关产品：

PMK0872 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (增强型)

PMK0988 Annexin V-fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒

PMK0996 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1 法)

PMK0998 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (红色荧光)

更多产品详情了解，请关注公众号：



