Meilun One Step TUNEL Apoptosis Assay Kit（FITC）

一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

产品编号：MA0223　　规格：20T/50T

产品内容

产品组成	MA0223-1　20T	MA0223-2　50T
TdT Dilution Buffer (选用)	500μl	1.25ml
TdT Enzyme (10×)	100μl	250μl
FITC-12-dUTP Labeling Mix	900μl	1.13ml×2
Proteinase K (2mg/ml)	40μl	100μl
DNase I (0.5mg/ml)	5μl	13μl
10×DNase I Buffer	100μl	250μl
说明书	1 份	1 份

产品简介

细胞凋亡（Apoptosis）的一个显著特点是细胞染色体DNA的降解，在一些内源性核酸内切酶的作用下，核小体间的DNA被切断，从而产生不同长度的寡聚核小体片段，表现为琼脂糖凝胶电泳中呈现特异的180-200 bp DNA Ladder图谱，而坏死细胞的DNA呈弥漫的连续图谱。

美仑一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(One Step TUNEL Apoptosis Assay Kit)采用TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling)方法，其原理为：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检测。

本试剂盒灵敏度高、特异性强、使用方便快捷。对于经过固定和洗涤的组织样本（石蜡切片、冰冻切片）和细胞样本（贴壁细胞、悬浮细胞），只需经过一步染色，洗涤后便可以进行凋亡检测。本试剂盒还提供了DNase I阳性对照和Proteinase K，以便操作。以50μl加样量为标准，MA0223-1可测定20次，MA0223-2可测定50次。

操作步骤

1 样本预处理

1.1 石蜡包埋组织切片

① 脱蜡：室温下将石蜡切片放入二甲苯中浸泡 5-10 分钟，更换新鲜的二甲苯再浸泡 5-10 分钟，以彻底脱掉石蜡。

② 水化：在无水乙醇中浸泡 5 分钟，更换新鲜的无水乙醇再浸泡 5 分钟。在梯度乙醇(90、80、70%)中各浸洗 1 次，每次 3 分钟，逐渐增加水分。

③ 洗涤：用 PBS 或 HBSS 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。此时可用石蜡笔或疏水笔在样品周围描绘样品分布的轮廓，以便后续操作。在实验过程中，切勿使样品干燥，处理好的样本应放于湿盒中保持湿润。

④ 通透：用 PBS 按照 1:100 的比例稀释 Proteinase K (2mg/ml)，使其终浓度为 20μg/ml。每个样本上滴加 100 μl 的 Proteinase K (20μg/ml)，使溶液覆盖全部样本区域，20-37℃孵育 15-30 分钟。

【注】：Proteinase K 有助于后续步骤中染色试剂的通透。孵育时间过短可能造成透性不充分从而影响标记效率，孵育时间过长则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。为得到最好的结果，需要自行优化 Proteinase K 孵育的温度和时间。

⑤ 洗涤：用 PBS 或 HBSS 润洗样本 2-3 次，轻轻吸干多余液体，处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

【注】：Proteinase K 需洗涤干净，以免干扰后续标记反应。

1.2 组织冰冻切片

① 固定：取出冰冻切片，并回温至室温。在组织固定液（美仑货号：MA0192）或 4%多聚甲醛（配制于新鲜的 PBS）中浸泡，室温下固定 30 分钟。

② 洗涤：轻轻吸干多余液体，并将切片浸没在 PBS 或 HBSS 中，室温孵育 10-15 分钟。按此步骤重复洗涤一次，然后轻轻吸干多余液体。此时可用石蜡笔或疏水笔在样品周围描绘样品分布的轮廓，以便后续操作。在实验过程中，切勿使样品干燥，处理好的样本应放于湿盒中保持湿润。

③ 通透：用 PBS 按照 1:100 的比例稀释 Proteinase K (2mg/ml)，使其终浓度为 20μg/ml。每个样本上滴加 100 μl 的 Proteinase K (20μg/ml)，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 10 分钟。

【注】：Proteinase K 有助于后续步骤中染色试剂的通透。孵育时间过短可能造成透性不充分从而影响标记效率，孵育时间过长则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。为得到最好的结果，需要自行优化 Proteinase K 孵育的温度和时间。

④ 洗涤：在 PBS 或 HBSS 中浸没洗涤样本 2-3 次，并用滤纸轻轻吸干多余液体。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

【注】：Proteinase K 需洗涤干净，以免干扰后续标记反应。

1.3 贴壁细胞或细胞涂片

① 洗涤：取出制备好的细胞爬片、涂片或是细胞贴壁良好的培养板，用 PBS 或 HBSS 洗涤一次。

② 固定：加入组织固定液（美仑货号：MA0192）或 4%多聚甲醛（配制于新鲜的 PBS），室温下固定 30 分钟。

③ 洗涤：用 PBS 或 HBSS 洗涤一次。

④ 通透：在样本上滴加适量通透液（建议使用含 0.3% Triton X-100 的 PBS），使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 5 分钟。

【注】：Triton X-100 有助于后续步骤中染色试剂的通透。孵育时间过短可能造成透性不充分从而影响标记效率，孵育时间过长则会增加细胞在后续洗涤步骤中脱落的风险。为得到最好的结果，需要自行优化通透温度和时间。

⑤ 洗涤：用 PBS 或 HBSS 洗涤 2-3 次。

【注】：通透液需洗涤干净，以免干扰后续标记反应。

1.4 悬浮细胞或细胞悬液

① 洗涤：离心收集细胞（建议 50 万~200 万个细胞），用 PBS 或 HBSS 洗涤一次。

② 固定：加入组织固定液（美仑货号：MA0192）或 4%多聚甲醛（配制于新鲜的 PBS），室温下固定 30 分钟。

【注】：为防止细胞聚团，应置于摇床上缓慢摇动进行固定。

③ 洗涤：用 PBS 或 HBSS 洗涤一次。

④ 通透：加入适量通透液（建议使用含 0.3% Triton X-100 的 PBS）重悬细胞，室温孵育 5 分钟。

【注】：Triton X-100 有助于后续步骤中染色试剂的通透。孵育时间过短可能造成透性不充分从而影响标记效率，孵育时间过长则会增加细胞破裂的风险。为得到最好的结果，需要自行优化通透温度和时间。

⑤ 洗涤：用 PBS 或 HBSS 洗涤 2-3 次。

【注】：通透液需洗涤干净，以免干扰后续标记反应。

2 DNase I 处理阳性对照（可选）

① 用去离子水按 1:10 的比例稀释 10×DNase I Buffer（例如:每个样本需用 200μl 1×DNase I Buffer，即用 20μl 10×DNase I Buffer 和 180μl 去离子水混合稀释），取其中 100μl 滴加到已通透的样本上，室温孵育 5min。向剩余 100μl 1×DNase I Buffer 中加 1μl DNase I (0.5mg/ml)，使其终浓度为 5μg/ml。

② 轻轻叩掉或吸掉液体，加入 100μl 含 5μg/ml DNase I 的缓冲液，室温孵育 10min。

③ 用 PBS 或 HBSS 洗涤 3-4 次。

【注】：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，经上述流程处理后通常会引起大多数细胞显现绿色荧光。

3 配制 TUNEL 检测液

计算好样本数量（包括实验组和阳性对照组），参考表 1 配制适当量的 TUNEL 检测液，即用即配，注意避光。对于涂片、切片或 96 孔板的一个孔，所需体积是 50μl，用 50μl 乘

以实验和阳性对照反应的数目来确定所需 TUNEL 检测液的总体积。对于表面积更大的样本（如 48 孔板、24 孔板、12 孔板、6 孔板的一个孔），可成比例的增大试剂体积。

组分	体积（μl/50μl 体系）
TdT Enzyme (10×)	5
FITC-12-dUTP Labeling Mix	45

表 1. 准备用于实验的和可选阳性对照反应的 TUNEL 检测液

【注】：阴性对照体系为不含 TdT Enzyme 的 TUNEL 检测液，即用 ddH_2O 替代 TdT Enzyme (10×)。如果 TUNEL 反应过强造成荧光背景高，可以用本试剂盒提供的 TdT Dilution Buffer 稀释 TdT Enzyme (10×)，即配制 TUNEL 检测液时，减少 TdT Enzyme (10×)的量，加入相应量的 TdT Dilution Buffer。

4 标记与检测

4.1 组织切片、贴壁细胞或细胞涂片：

① 在样本上滴加 TUNEL 检测液。如果待检样本为涂片、切片或在 24 孔板、12 孔板、6 孔板中，可以使用防蒸发膜，或自行用自封袋或其他适当材料裁剪成比孔略小的圆形塑料片，滴加 TUNEL 检测液后覆盖在样本上，可以使 TUNEL 检测液覆盖更均匀，并且防止蒸发。也可以用 PAP Pen 圈出一个区域进行染色。载玻片需置于湿盒内，细胞培养板中多余的孔和多孔板的空隙中加入适量水以保持湿润。

② 37℃避光孵育 60 分钟。

③ PBS 或 HBSS 洗涤 2-3 次。

④ 用抗荧光衰减封片剂（美仑货号：MA0235 或 MA0236-含 DAPI）封片后，在荧光显微镜下观察。可以使用的激发波长范围为 450-500nm，发射波长范围为 515-565nm (绿色荧光)。

4.2 悬浮细胞或细胞悬液

① 用 50μl TUNEL 检测液重悬细胞。

② 37℃避光孵育 60 分钟，每隔 15 分钟用微量移液器轻轻重悬细胞。

③ PBS 或 HBSS 洗涤 2 次。

④ 用 250-500μl PBS 或 HBSS 重悬细胞。

⑤ 用流式细胞仪分析细胞或者涂片后在荧光显微镜下观察。可以使用的激发波长范围为 450-500nm，发射波长范围为 515-565nm (绿色荧光)。

保存条件

-20 ℃保存，自生产之日起12个月有效。FITC-12-dUTP Labeling Mix需避光保存。

注意事项

1. 配制 TUNEL 检测液之后的步骤注意避光操作。
2. 若配制 TUNEL 检测液操作时间较长，请将 TdT Enzyme (10×)、FITC-12-dUTP Labeling Mix 和配好的检测液置于冰上暂时保存。
3. 需自备 PBS 或 HBSS，抗荧光衰减封片剂(美仑货号：MA0235 或 MA0236-含 DAPI)，组织固定液（美仑货号：MA0192）或 4%多聚甲醛，Triton X-100，二甲苯，无水乙醇等。
4. PBS 或 HBSS 清洗后，为了各种反应的有效进行，请尽量除去 PBS 或 HBSS 溶液后再进行下一步反应。
5. 结果分析时注意：在坏死的晚期阶段或在高度增殖/代谢的组织细胞中可产生大量 DNA 片断，从而引起假阳性结果；而有些类型的凋亡性细胞死亡缺乏 DNA 断裂或 DNA 裂解不完全，以及细胞外的矩阵成分阻止 TdT 进入胞内反应，进而产生假阴性结果。
6. 为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

问题与解决方法

问题	可能原因	建议
非特异性荧光标记	TdT 酶的浓度过高。	可以使用试剂盒中的 TdT Dilution Buffer 做 2-5 倍稀释（根据操作步骤说明）。
	TUNEL 检测反应时间过长或孵育过程中检测液渗漏，造成细胞或组织表面不能保持湿润。	注意控制反应时间，并确保 TUNEL 检测液能很好地覆盖样品。
	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）。	尝试改用其它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。	建议采用推荐的固定液。
	有些细胞或组织，例如平滑肌细胞或组织，在固定后核酸酶活性水平依然较高，导致 DNA 断裂。	1. 取细胞或组织后立即固定并且要充分固定，以阻止这些酶导致假阳性。 2. 用含有 dUTP 和 dATP 的溶液封闭。
标记效率低	使用乙醇或甲醇固定会导致标记的效率较低。（因为在固定时染色质未能与蛋白质交联，而在操作中丢失。）	建议采用推荐的固定液。
	固定时间过长，导致交联程度过高。	减少固定时间，或用溶于 PBS 的 2%多聚甲醛固定。
	蛋白酶 K 或 Triton X-100 的通透不充分，导致试剂不能达到靶分子或浓度过低。	1. 增加通透剂的孵育时间 2. 增加通透剂的作用温度（15-25℃） 3. 优化通透剂的作用浓度（如：蛋白酶 K 以 400μg/ml 作用 5 分钟） 4. 0.1M 的柠檬酸钠 70℃作用 30 分钟。
	荧光淬灭。fluorescein 在普通光照 10 分钟就会严重淬灭。	注意避光操作。
	碘化丙啶（PI）双染时，如果 PI 染色过深会导致观察到的本试剂盒的 TUNEL 染色效果减弱。PI 可以接受 fluorescein 激发产生的荧光，从而起到淬灭作用。	用较低浓度的 PI 染色，例如 0.5 μg/ml。
	贴壁细胞如果使用药物诱导凋亡，会使发生凋亡细胞的贴壁性减弱。	建议在凋亡诱导结束后，用多孔板离心机 1000g 离心 5 分钟，然后再吸除培养基并洗涤。如果没有适合的离心机，请注意操作轻柔，防止洗涤时将凋亡细胞冲掉。后续整个操作都要轻柔。
荧光背景高	支原体污染。	请使用支原体检测试剂盒（美仑货号：MA0344）检测是否为支原体污染。
	TdT 酶的浓度过高或反应时间过长。	可以使用试剂盒中的 TdT Dilution Buffer 做 2-5 倍稀释（根据操作步骤说明）。
	红细胞中血红蛋白导致的自发荧光产生严重干扰。	宜选择其它细胞凋亡检测试剂盒。
	高速分裂和增殖的细胞，有时也会出现细胞核中的 DNA 断裂。	调整最适合细胞浓度和状态。
最后显微镜或流式细胞仪分析只剩下很少的细胞	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) 包被比多聚赖氨酸 (poly-L-lysine) 效果更好。
	在操作过程中丢失大量细胞。	1. 提高起始的细胞量。 2. 在制备贴到载玻片的细胞悬液时，离心过程中用含 1%BSA 的 PBS 洗细胞。 3. 在制备细胞悬液时，离心过程中用含 1%BSA 的 PBS 洗细胞。 4. 降低蛋白酶 K 的通透时间，防止酶把细胞消化下来。
阳性对照没有信号	DNase I 的浓度过低。	冷冻切片使用 10-15μg/ml 的 DNase I； 石蜡切片使用 15-25μg/ml 的 DNase I； 细胞样本使用 5-10μg/ml 的 DNase I。

S250402