

# 一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(555红色荧光)

One-step TUNEL Cell Apoptosis Detection Kit (Red, Dye 555)

本产品需冰袋运输，-20℃避光保存，保质期12个月。

## 货号规格

货号	规格
CX108S	20次
CX108	50次
CX108L	100次 (CX108×2)

## 产品内容

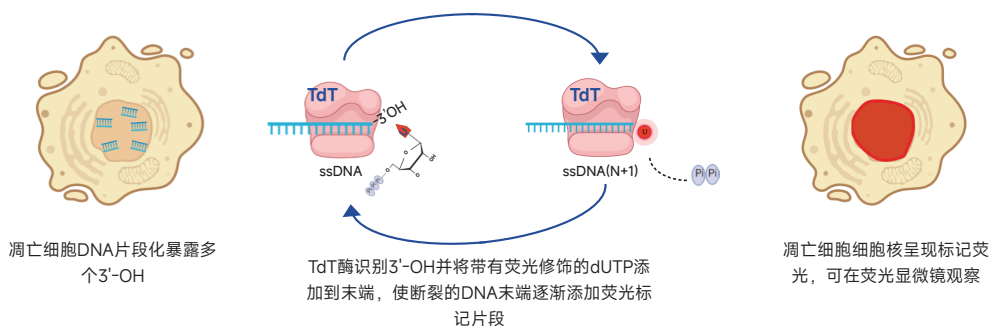
组分	CX108S	CX108	CX108L
Recombinant TdT Enzyme	100 μL	250 μL	250 μL×2
Advanced 555 Labeling Mixture	900 μL	1.13 mL×2	1.13 mL×4
DNase I (30 U/μL)	10 μL	25 μL	25 μL×2
DNase I Buffer (10×)	100 μL	250 μL	250 μL×2
Proteinase K (2 mg/mL)	20 μL	50 μL	50 μL×2

## 产品简介

本产品采用 TUNEL(TdT mediated dUTP Nick End Labeling) 法，可高灵敏度且简单快速地检测细胞凋亡，对于细胞样本（细胞涂片、细胞爬片、悬浮细胞）或组织样本（石蜡切片、冰冻切片），只需经过一步染色反应，洗涤后可通过荧光显微镜或流式细胞仪检测被标记上红色荧光的凋亡细胞。

细胞凋亡时，细胞内的特异性核酸内切酶会被活化，并使染色质 DNA 在核小体间被特异性切割，DNA 降解成 180~200 bp 或其它整数倍片段。DNA 分子断裂产生的 3'-OH 末端可以在末端脱氧核糖核苷酸转移酶（Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT）的作用下结合 Dye555-dUTP，被标记的 DNA 可以直接使用荧光显微镜观察或通过流式细胞仪进行定量分析，从而反映细胞凋亡的水平。

示意图如下：



## 适用样本

组织样本（石蜡切片、冰冻切片）及细胞样本（细胞爬片、细胞涂片、悬浮细胞）。

## 自备试剂

DAPI、Triton X-100、1×PBS、4% 多聚甲醛、无水乙醇。

## 操作步骤

### 配置工作液

1×Proteinase K 工作液：（用于组织切片通透，细胞爬片 / 涂片无需使用）取 1 μL Proteinase K (2 mg/mL) 加入 99 μL 1×PBS 中，混匀。现用现配。

1×DNase I 工作液：用去离子水按 1:10 的比例将 DNase I Buffer (10×) 稀释成 1×DNase I Buffer，用 1×DNase I Buffer 按 1:100 的比例稀释 DNase I (30 U/μL)，使其终浓度为 0.3 U/μL，现用现配。

注意：DNase I 会在剧烈混合下变性，建议不要涡旋 DNase I 溶液。

### 样本预处理

#### A. 贴壁细胞（细胞爬片 / 涂片）

##### 1. 准备细胞爬片：

在 TC 处理的细胞爬片上培养贴壁细胞。在对细胞进行凋亡诱导处理之后，吸弃爬片上的残留培养基，转步骤 2；

##### 准备细胞涂片：

以  $2 \times 10^6$  cells/mL 的浓度将细胞重悬于 1×PBS 中。吸取 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，转步骤 2。

2. 固定：将爬片 / 涂片浸入 1×PBS 配制的 4% 多聚甲醛溶液，常温进行细胞固定 15 min；

3. 将爬片 / 涂片浸入 1×PBS 中漂洗 2 次；

4. 轻柔地去掉多余液体，并用吸水纸吸干爬片 / 涂片上样本周围的液体；

5. 通透：将爬片 / 涂片浸入 1×PBS 配制的 0.2% Triton X-100 溶液中，常温孵育 10 min；

6. 将 1×PBS 滴加到样本上润洗 2~3 次。轻柔地去掉多余的液体，并用吸水纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。在实验过程中，切勿让样本干燥。处理好的样本需放入湿盒中保持湿润。

#### B. 悬浮细胞

1. 取  $3 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$  个细胞，加入三倍体积的 1×PBS，轻柔混匀，离心 5 min ( $300 \times g$ , 4°C)，弃上清；

2. 固定：向细胞中加入 2 mL 1×PBS 配制的 1% 多聚甲醛溶液，4°C 进行细胞固定 20 min；

3. 离心 5 min ( $300 \times g$ , 4°C)，弃上清，用 1 mL 1×PBS 重悬细胞；

4. 再次离心 5 min ( $300 \times g$ , 4°C)，弃上清；

5. 通透：加入 2 mL 70% 乙醇（冰上预冷）缓慢吹打沉淀的细胞，冰上破膜 30 min；

注意：① 通透后的细胞折射率会下降，导致其边缘模糊不易观察，操作过程中应格外小心，避免丢失细胞；

② -20°C 的条件下，细胞能在 70% 乙醇中保存一周。

6. 将通透后的细胞离心 5 min ( $300 \times g$ , 4°C)，弃上清，用 2 mL 1×PBS 重悬细胞；

7. 再次离心 5 min ( $300 \times g$ , 4°C)，弃上清，用 1 mL 1×PBS 重悬细胞；

8. 转移  $2 \times 10^6$  个细胞至新的 1.5 mL 离心管中，进行后续标记实验；若进行阳性对照制备，因为经 DNase I 处理后，细胞数量会减少一个数量级，所以需准备  $2 \times 10^7$  个细胞。

### C. 石蜡切片

1. 脱蜡：将石蜡切片置于二甲苯中浸泡 10 min；换用新鲜二甲苯再浸泡 10 min；更换 50% 的二甲苯再浸泡 5 min；无水乙醇中浸泡 5 min；更换新的无水乙醇再浸泡 5 min；更换 95% 乙醇浸泡 5 min；更换 85% 乙醇浸泡 5 min；更换 75% 乙醇浸泡 5 min；更换 50% 乙醇浸泡 5 min；更换 30% 乙醇浸泡 5 min；更换 1×PBS 浸泡 5 min；
2. 通透：用吸水纸吸干载玻片上切片组织周围及背面的多余液体，每个样本上滴加 100 μL 1×Proteinase K 工作液，使溶液覆盖全部样本区域，37°C 反应 10 min；

注意：不同组织或物种的样本所需反应时长可能不同，Proteinase K 通透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，时间过短则可能造成通透处理不充分，影响后续标记效率。建议进行预实验，确定最佳 Proteinase K 孵育时长。

3. 将通透后的样本用 1×PBS 润洗 3 次。轻柔地去掉多余液体，并用吸水纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。在实验过程中，切勿让样本干燥。处理好的样本需放入湿盒中保持湿润。

注意：若组织自发荧光较强，可在通透后向样本滴加荧光淬灭剂（50 mM 乙酸铵，1 mM 硫酸铜），覆盖全部样本区域，处理 10min，消除组织自发荧光干扰。再用 1×PBS 润洗 5 次，避免淬灭剂对 TUNEL 的影响。

### D. 冰冻切片

1. 固定：将冰冻切片平衡至常温，浸入 1×PBS 配制的 4% 多聚甲醛溶液，常温固定 15 min；
2. 将固定后的冰冻切片用 1×PBS 润洗 2 次；
3. 通透：用吸水纸吸干载玻片上切片组织周围及背面的多余液体，每个样本上滴加 100 μL 1×Proteinase K 工作液，使溶液覆盖全部样本区域，37°C 反应 10 min；

注意：不同组织或物种的样本所需反应时长可能不同，Proteinase K 通透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，时间过短则可能造成通透处理不充分，影响后续标记效率。建议进行预实验，确定最佳 Proteinase K 孵育时长。

4. 将通透后的样本用 1×PBS 润洗 3 次。轻柔地去掉多余液体，并用吸水纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。在实验过程中，切勿让样本干燥。处理好的样本需放入湿盒中保持湿润。

注意：若组织自发荧光较强，可在通透后向样本滴加荧光淬灭剂（50 mM 乙酸铵，1 mM 硫酸铜），覆盖全部样本区域，处理 10min，消除组织自发荧光干扰。再用 1×PBS 润洗 5 次，避免淬灭剂对 TUNEL 的影响。

## 标记及检测

### 1. 分组设置

分组	样本选择	处理方式	目的
实验组	待检测样本	孵育标记工作液	实验数据来源
阳性对照	任选一个实验组样本	DNase I 处理使染色体 DNA 会发生断裂，产生暴露的 3'-OH 末端，作为阳性样本	验证实验流程和试剂的有效性
阴性对照	任选一个实验组样本	标记工作液中不含 TdT 酶	排除样本自发荧光及非特异性标记 调整曝光强度

### 制备阳性对照

(1) 向通透后的样本（如果是悬浮细胞，需要离心去除上清）加入 50 μL 1×DNase I 工作液（0.3 U/μL），一定要覆盖住整个样本，常温孵育 10 min；

(2) 将样本用 1×PBS 润洗 3 次。

注意：阳性对照组必须与其它实验组分开处理，否则残留的 DNase I 可能会使实验组出现假阳性信号。

2. 按照下表配制标记工作液（冰上操作，配制前请确保 Advanced 555 Labeling Mixture 已完全融化为液体）：

组分	样本/阳性对照	阴性对照
Advanced 555 Labeling Mixture	45 $\mu$ L	45 $\mu$ L
Recombinant TdT Enzyme	5 $\mu$ L	-
dd H <sub>2</sub> O	-	5 $\mu$ L

注意：以上体系为单个样本所需标记工作液的用量，50  $\mu$ L $\times$  样本 / 对照数量 即为所需标记工作液的总体积。

### 3. 标记与检测：

#### A. 对于细胞爬片 / 涂片、石蜡切片或冰冻切片

(1) 用吸水纸吸去预处理后的样本上多余的液体，若样本为 9 mm 细胞爬片或相似面积的其它样本，在其上滴加 50  $\mu$ L 上步配制的标记工作液即可完全覆盖样本，若样本面积较大，可按比例增加标记工作液用量，保证工作液完全覆盖样本即可；

注意：① 请严格避免孵育过程中发生干片；

② 滴加标记工作液后，样本需要避光处理。

(2) 将样本置于湿盒内（湿盒的底部需加水保持湿润），37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min；

(3) 轻柔地去掉样本上多余的液体，用 1 $\times$ PBS 漂洗 3 次；

(4) 用吸水纸轻柔地吸干样本周围多余的液体，并向样本区域滴加适量 1 $\times$ PBS 配制的 20% 甘油（例如 9 mm 细胞爬片需滴加 10  $\mu$ L 20% 甘油），对样本进行封片，即可在荧光显微镜直接观察分析样本。若使用玻底培养皿进行观察，只需加入适量 1 $\times$ PBS 保持样本湿润即可；

注意：① 无需使用抗荧光淬灭封片剂封片，只需保持样品表面湿润，4 $^{\circ}$ C 保存，荧光信号可保持一周；

② 如需 DAPI 复染，可在甘油封片前加入用 1 $\times$ PBS 配制的 2  $\mu$ g/mL DAPI 溶液，常温避光孵育 5 min。用 1 $\times$ PBS 漂洗 3 次后再进行甘油封片。

(5) 立即在荧光显微镜下观察分析样本。

◆ 555 红色荧光染料的最大激发波长是 554 nm，最大发射波长是 567 nm；

◆ DAPI 与双链 DNA 结合时最大激发波长是 358 nm，最大发射波长是 461 nm；

#### B. 对于悬浮细胞

(1) 对于  $2\times 10^6$  个细胞的一个标准反应，所需标记工作液的用量是 50  $\mu$ L。将预处理步骤准备好的  $2\times 10^6$  个通透后的细胞离心 5 min (300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C)，弃上清，加入 50  $\mu$ L 标记工作液重悬细胞，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min，每隔 15 min 轻弹管壁或用微量移液器轻轻重悬细胞；

(2) 将标记后的细胞离心 5 min (300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C)，弃上清，用 1 $\times$ PBS 漂洗 3 次，每次 5 min；

(3) 用 250~500  $\mu$ L 1 $\times$ PBS 重悬细胞；

(4) 流式细胞仪分析细胞或者涂片后在荧光显微镜下观察，参考前述激发 / 发射波长。

## 注意事项

1. 本说明书中推荐的实验条件是通用的，用户可根据不同的样本类型和预实验结果，对样本处理时间、试剂浓度等条件进行优化，以确定最适实验条件；
2. 产品组分避免反复冻融；
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
4. 本产品仅限科研使用。