

一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(TRITC, 红色荧光)

One-step TUNEL Cell Apoptosis Detection Kit (RED, TRITC)

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
CX106S	20次
CX106	50次
CX106L	100次 (CX106×2)

产品内容

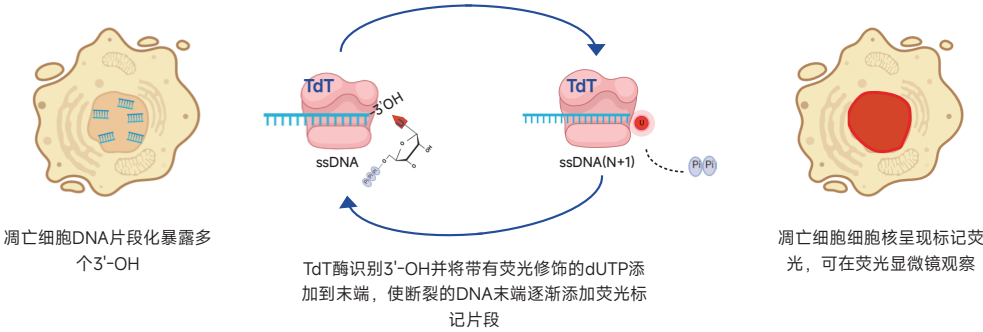
组分	CX106S	CX106	CX106L
Recombinant TdT Enzyme (10×)	100 μL	250 μL	250 μL×2
TdT Dilution Buffer (选用)	500 μL	1.25 mL	1.25 mL×2
TRITC Labeling Mixture	900 μL	1.13 mL×2	1.13 mL×4
DNase I (0.5 mg/mL)	5 μL	13 μL	13 μL×2
DNase I Buffer (10×)	100 μL	250 μL	250 μL×2
Proteinase K (2 mg/mL)	40 μL	100 μL	100 μL×2

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，洗涤后便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 TRITC-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

Proteinase K 工作液：取 1 μ L Proteinase K (2 mg/mL) 加入 99 μ L 1 $\times$ PBS 中，混匀，现用现配。

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，用 1 $\times$ PBS 漂洗爬片两次，转步骤 2；

准备细胞涂片：

以 2×10^6 cells/mL 的浓度将细胞重悬于 1 $\times$ PBS 中。吸取 50~100 μ 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地涂开细胞悬液，转步骤 2。

2. 固定：将爬片 / 涂片浸入 1 $\times$ 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 $\times$ PBS 中漂洗两次，每次常温放置 5 min；

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：在每个样本上滴加 100 μ L Proteinase K 工作液，使溶液覆盖全部样本区域，常温孵育 10 min；也可将爬片 / 涂片浸于 1 $\times$ PBS 配制的 0.2% Triton X-100 溶液中，常温孵育 10 min；

注意：① Proteinase K 通透时长很关键，时间过长会增加细胞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；

② 细胞爬片 / 涂片在处理时较易脱片，因此建议使用 0.2% Triton X-100 溶液进行通透，以避免脱片的发生。

6. 用 1 $\times$ PBS 润洗样本 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 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞，用 1 $\times$ PBS 漂洗两次，每次离心 5 min (300 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C)，然后用 0.5 mL 1 $\times$ PBS 重悬；

2. 固定：向细胞悬液中加入 5 mL 1 $\times$ PBS 配制的 1% 多聚甲醛溶液，4 $^{\circ}$ C 进行细胞固定 20 min；

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

4. 再次离心 5 min (300 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C)，弃上清，用 0.5 mL 1 $\times$ PBS 重悬细胞；

5. 通透：向细胞悬液中加入 5 mL 70% 乙醇（冰上预冷），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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C)，弃上清，用 5 mL 1 $\times$ PBS 重悬细胞；

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

8. 转移 2×10^6 个细胞至新的 1.5 mL 离心管中，进行后续标记实验或阳性对照制备。

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 $\times$ PBS 浸泡 5 min；

2. 通透：用吸水纸吸干载玻片上切片组织周围的多余液体，每个样本上滴加 100 μ L Proteinase K 工作液，使溶液覆盖全部样本区域，37 $^{\circ}$ 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. 将通透后的样本浸入 1×PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。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。

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浸入 1×PBS 漂洗两次，每次 5 min；
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 μ L 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. 将通透后的样本浸入 1×PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。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。

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) 用去离子水按 1:10 的比例稀释 DNase I Buffer (10×) < 例如：每个样本需使用 200 μ L 1×DNase I Buffer，即用 20 μ L DNase I Buffer (10×) 和 180 μ L 去离子水混合稀释 >，取其中 100 μ L 滴加到已通透的样本上（如果样本是悬浮细胞，需提前离心去除上清），室温孵育 5 min；
- (2) 配制 DNase I 工作液：向剩余的 100 μ L 1×DNase I Buffer 中加 1 μ L DNase I (0.5 mg/mL)，使其浓度为 5 μ g/mL，现配现用；
注意：DNase I 会在剧烈混合下变性，建议不要涡旋 DNase I 溶液。
- (3) 用移液器轻轻吸除样本上的液体，加入 100 μ L DNase I 工作液 (5 μ g/mL)，一定要覆盖住整个样本，常温孵育 10 min；
- (4) 将样本浸入 1×PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
注意：阳性对照必须使用单独的染色缸，否则其上残留的 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：

组分	样本/阳性对照	阴性对照
Recombinant TdT Enzyme (10×)	5 μ L	-
TRITC Labeling Mixture	45 μ L	45 μ L
dd H ₂ O	-	5 μ L

- 注意：① 以上为单个样本所需标记工作液的用量, $50\ \mu\text{L} \times \text{样本} / \text{对照数量}$ 即为所需标记工作液的总体积。
- ② 如果 TUNEL 反应过强造成荧光背景过高, 可以用本试剂盒提供的 TdT Dilution Buffer 稀释 Recombinant TdT Enzyme (10 $\times$), 即配制 TUNEL 检测液时, 减少 Recombinant TdT Enzyme (10 $\times$) 的用量, 用相应量的 TdT Dilution Buffer 补足。

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 $50\ \mu\text{L}$ 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 请严格避免干片;
② 请勿将吸水纸接触到细胞或者组织;
③ 滴加标记工作液后, 样本需要避光处理。
- (2) 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分布均匀, 将样本置于湿盒内 (湿盒的底部需铺上用水浸湿的纸巾), 37°C 避光孵育 60 min;
- (3) 轻柔地去掉样本上多余的液体, 用 $1\times\text{PBS}$ 漂洗 3 次, 每次 5 min;
注意: 为将游离的未反应标记物去除干净, 样本在用 $1\times\text{PBS}$ 漂洗后, 可用含 0.1% Triton X-100 和 5 mg/mL BSA 的 $1\times\text{PBS}$ 再漂洗 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 $1\times\text{PBS}$ 配制的 20% 甘油 (例如 9 mm 细胞爬片需滴加 $10\ \mu\text{L}$ 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 $1\times\text{PBS}$ 保持样本湿润即可;
注意: 如需 DAPI 复染, 可在甘油封片前加入用 $1\times\text{PBS}$ 配制的 $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 溶液, 常温避光孵育 5 min。用 $1\times\text{PBS}$ 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。
 - ◆ TRITC 的最大激发波长是 557 nm, 最大发射波长是 576 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 2×10^6 个细胞的一个标准反应, 所需标记工作液的用量是 $50\ \mu\text{L}$ 。将预处理步骤准备好的 2×10^6 个通透后的细胞离心 5 min ($300\times g$, 4°C), 弃上清, 加入 $50\ \mu\text{L}$ 标记工作液重悬细胞, 37°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°C), 弃上清, 用 $1\times\text{PBS}$ 漂洗 3 次, 每次 5 min;
- (3) 用 $250\sim 500\ \mu\text{L}$ $1\times\text{PBS}$ 重悬细胞;
- (4) 用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。