EZ 640 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（远红荧光）

产品描述

细胞发生凋亡时，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，产生 180bp-200bp 的 DNA 片段，表现为琼脂糖凝胶电泳中呈现的特异的梯状 Ladder 图谱。基因组 DNA 双链或单链断裂时会出现产生大量的粘性 3'-OH 末端，可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT）的催化作用下，与 dUTP 结合，从而通过荧光显微镜或流式细胞仪直接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。Tunel 法可以对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色，能准确地反应细胞凋亡典型的生物化学和形态特征，可检测出极少量的凋亡细胞，因而在细胞凋亡的研究中广泛采用。

本试剂盒应用范围广，可用于检测冷冻或石蜡切片中的细胞凋亡情况，也可检测培养的贴壁细胞或悬浮细胞的凋亡情况。可选择性的检测凋亡细胞，而非坏死细胞或因辐照和药物治疗而造成的 DNA 链断裂的细胞。本试剂盒检测细胞凋亡，耗时短，只需一步染色反应，洗涤后即可检测。

订购信息

产品名称	货号	规格
EZ 640 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（远红荧光）	AC12L058	20T
EZ 640 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（远红荧光）	AC12L059	50T

产品组分

组分	AC12L058（20T）	AC12L059（50T）
A. EZ 640 TUNEL Reaction Buffer	1 mL	2 * 1.25 mL
B. TdT Enzyme	40 μL	100 μL
C. Proteinase K (2 mg/mL)	40 μL	100 μL
D. DNase I (2 U/μL)	5 μL	13 μL
E. 10 × DNase I Buffer	100 μL	260 μL

运输与保存

蓝冰运输。-20°C保存，有效期 24 个月。**注：**组分 A 需避光保存，避免反复冻融。

产品参数

Ex(nm)：642　　**Em(nm)：**662

实验材料（自备）

PBS 缓冲液（1×，pH~7.4）
0.4% Triton X-100（PBS 配制）
0.1% Triton X-100（PBS 配制，其中含 5 mg/mL BSA）
4%多聚甲醛（PBS 配制）
免疫组化笔
脱蜡溶剂（石蜡切片样本）
石蜡切片处理相关试剂
抗荧光淬灭封片剂
ddH_2O

使用方法

一、实验设计

A. **阳性对照：**DNase I 处理制备阳性对照载玻片。DNase I 可以消化单链或双链 DNA 暴露 3'-OH 末端，人为造成细胞凋亡。每次实验做一次即可（用来验证本次实验操作和试剂盒有无问题）。

B. **阴性对照：**使用不含 TdT Enzyme 的 TUNEL Reaction Buffer，用 ddH_2O 替代 TdT Enzyme（主要是排除细胞自身凋亡、操作过程等原因导致的非特异性染色以及调整拍摄曝光强度）。

C. **实验处理组：**实验组按照说明书正常操作。

D. **实验对照组：**实验组按照说明书正常操作。

二、实验步骤

1. 样本准备：

(1) 对于贴壁细胞或细胞涂片

a. PBS 清洗 1 次。**注：**如果担心细胞涂片的细胞贴得不牢，可以干燥样品使细胞贴得更牢。

b. 固定：加入适量 4%多聚甲醛（PBS 配制），4°C固定 30 min。PBS 清洗 2 次。

c. 通透：加入适量 0.4% Triton X-100（PBS 配制），室温通透 20 min。PBS 清洗 2 次。

d. 转步骤 2. TUNEL 反应。

(2) 对于悬浮细胞或细胞悬液

a. 收集细胞（ 3-5×10^6 个细胞），1000 rpm 离心 5 min，PBS 清洗 2 次。

b. 固定: 加入适量 4%多聚甲醛（PBS 配制）充分重悬细胞，4°C固定 30min。2000rpm 离心 5min，PBS 清洗 2 次。

c. 通透: 加入适量 0.4% Triton X-100 (PBS 配制)，室温通透 20min。2000rpm 离心 5min，PBS 清洗 2 次。

d. 转步骤 2. TUNEL 反应。

(3) 石蜡组织切片

a. 将石蜡切片置于切片架上，放置于 60°C烘箱中烤片 60min。

b. 脱蜡与水化: 将切片样本依次放入二甲苯 I (10min) → 二甲苯 II (10min) → 100%乙醇 I (5min) → 100%乙醇 II (5min) → 95%乙醇 (5min) → 90%乙醇 (5min) → 80%乙醇 (5min) → 70%乙醇 (5min) → ddH_2O 冲洗 5min，冲洗 2 次。**注：**二甲苯有毒，易挥发，请在通风橱中进行此操作。

c. 用滤纸吸干切片样本周围液体，用免疫组化笔圈好样本轮廓，以便下游通透与标记。**注：**若在后续实验操作中发现免疫组化笔画的轮廓圈被破坏，需及时补画。

d. 通透：按 1:50 的比例，将 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度 40 μg/mL，在每个样本上滴加 100 μL，使溶液覆盖全部样本区域，37°C孵育 30 min。**注：**Proteinase K 可通透细胞膜和核膜，

从而使后续步骤的染色试剂充分进入细胞核进行反应，提高标记效率。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。为得到更好的结果，Proteinase K 的浓度、孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化。

e. 将切片样本浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min，用滤纸吸去多余的液体，将处理好的样本放在湿盒中保持湿润。**注：**这一步必须把 Proteinase K 洗涤干净，否则会严重干扰后续的标记反应。

f. 转步骤 2. TUNEL 反应。

(4) 冰冻组织切片

a. 固定：取出冰冻切片，并回温至室温。将切片样本浸入 4%多聚甲醛（PBS 配制）中，室温固定 30min。将切片样本浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 10min。**注：**若是担心甲醛清洗不干净，影响最终染色效果。可在甲醛固定完成后加入适量 2 mg/mL 甘氨酸清洗 10 min，中和残留的固定液，再进行 PBS 清洗。

b. 用滤纸吸干切片样本周围液体，用免疫组化笔圈好样本轮廓，以便下游通透与标记。**注：**若在后续实验操作中发现免疫组化笔画的轮廓圈被破坏，需及时补画。

c. 通透：按 1:50 的比例，将 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度 40 μg/mL，在每个样本上滴加 100 μL，使溶液覆盖全部样本区域，37°C孵育 20 min。**注：**Proteinase K 可通透细胞膜和核膜，从而使后续步骤的染色试剂充分进入细胞核进行反应，提高标记效率。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。为得到更好的结果，Proteinase K 的浓度、孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化。如优化 Proteinase K 的浓度与孵育时间仍无法改善染色效果，可选择将样本浸入 1%Triton X-100（PBS 配制）中，室温促渗 3-5min；之后将切片样本浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。

d. 将切片样本浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min，用滤纸吸去多余的液体，将处理好的样本放在湿盒中保持湿润。**注：**这一步必须把 Proteinase K 洗涤干净，否则会严重干扰后续的标记反应。

e. 转步骤 2. TUNEL 反应。

(5) 阳性处理（仅阳性对照进行此步骤，其他样品直接进行 TUNEL 反应步骤）

a. 按 1:10 的比例用 ddH_2O 将 10× DNase I Buffer 稀释成 1× DNase I Buffer 备用。

b. 滴加 100 μL 1× DNase I Buffer 到已处理的样本上，覆盖全部样本区域，室温平衡 5min。

c. 用 1× DNase I Buffer 以 1: 100 稀释 DNase I (2 U/μL)至终浓度 20 U/mL 的工作液。

d. 弃去 Buffer，加入 100 μL 浓度为 20 U/mL 的 DNase I 工作液，室温孵育 15min。

e. 弃去 DNase I 工作液，PBS 清洗 2 次。

f. 转步骤 2. TUNEL 反应。

2. TUNEL 反应

(1) 配制 TUNEL 反应液（即用即配）：

	1 个样本	5 个样本	10 个样本
TdT 酶	2 μL	10 μL	20 μL
EZ 640 TUNEL Reaction Buffer	48 μL	240 μL	480 μL
TUNEL 反应液总体积	50 μL	250 μL	500 μL

(2) 对于贴壁细胞、细胞涂片或组织切片

a. 每个样本加入 50 μL TUNEL 反应液，使反应液均匀覆盖样本。37°C避光孵育适宜的时间（细胞推荐染色时间 15min-30h，组织染色时间推荐 1h）。**注：** 50μL TUNEL 反应液适合涂片、切片或 96 孔板（其他不同孔板可以适当调整 TUNEL 反应液体积，覆盖细胞即可）。如果待检测的样品为涂片、切片或在 24 孔板、12 孔板或 6 孔板中，可以使用防蒸发膜，或自行尝试使用自封袋或者其它适当材料自行裁剪成比孔略小的圆形塑料片，滴加 TUNEL 反应液后覆盖在样品上，可以防止 TUNEL 反应液蒸发，并且使 TUNEL 反应液均匀覆盖样本。

b. 弃去 TUNEL 反应液，PBS 清洗 2 次后，再用 0.1% Triton X-100（PBS 配制，其中含 5mg/mL BSA）清洗 3 次，每次 5min，这样游离的未反应的标记物可以清除较干净。

c. （可选）每个样本加入适量浓度为 5 μg/mL 的 DAPI 染液，室温避光孵育 5min。染色完成后，弃去 DAPI 染液，PBS 清洗 2 次，每次 5min。

d. （可选）切片封片：每个样本滴加 20 μL 抗荧光淬灭封片剂（货号：AC28L532），抗荧光淬灭封片剂可能会不适用于某些染料，实验前建议进行预实验测试匹配性），盖上盖玻片，用镊子的钝端轻轻敲击盖玻片，去除气泡以使封片完全。

e. 用滤纸吸去多余的液体，向样本区域加 100μL PBS 保持样本湿润，立即在荧光显微镜下观察。

(3) 对于悬浮细胞或细胞悬液

a. 每个样本管加入 50 μL TUNEL 反应液轻轻重悬细胞，37°C避光孵育 15-30min。每隔 10min 用微量移液器轻轻重悬细胞。

b. 2000rpm 离心 5min，弃去 TUNEL 反应液，加入适量 0.1% Triton X-100（PBS 配制，其中含 5mg/mL BSA）清洗 2 次，每次 5min，这样游离的未反应的标记物可以清除较干净。

c. 每个样本管加入 100μL 浓度为 5μg/mL 的 DAPI 染液，室温避光孵育 5min。

d. 加入 400μL PBS 重悬细胞，立即用流式细胞仪检测或进行涂片后在荧光显微镜下观察。

注意事项

1. 本产品仅限于科学实验研究使用，不得用于临床诊断、治疗等领域。
2. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
3. 染色背景较重或非特异性着色明显时可适当减少染色时间。
4. 实验时建议增加阴性对照和阳性对照组。
5. 组分 A 使用时请佩戴口罩、手套，如接触皮肤，请立即用大量水冲洗。
6. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品推荐

EZ Trans 细胞转染试剂（高效）（货号：AC04L092）

快速细胞冻存液（无血清、无蛋白）（货号：AC05L033）