# TUNEL　细胞凋亡检测试剂盒（绿色 FITC　标记荧光检测法，通用型）　C0001　C0002

**描述：**

细胞凋亡中染色体 DNA 的断裂是个渐进的阶段性过程。染色体 DNA 首先在内源性的核酸水解酶的作用下降解为 50-300 kb 的大片段，然后大约 30%的染色体 DNA 在 $Ca^{2+}$和 $Mg^{2+}$依赖的核酸内切酶作用下，在核小体单位之间被随机切断，形成 180-200 bp 核小体 DNA 多聚体。因此在细胞凋亡晚期，DNA 会被降解为 180-200 bp 的片段，断裂的基因组 DNA 上暴露出大量的 3'-OH 末端。末端脱氧核糖核苷酸转移酶（Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT）是一种不依赖于模板的 DNA 聚合酶，可以催化脱氧核苷酸结合到断裂的 DNA 分子 3'-OH 末端。因此 TUNEL (TdT mediated dUTP Nick End Labeling)细胞凋亡检测试剂盒可以用来检测组织细胞在凋亡晚期过程中细胞核 DNA 的断裂情况。其原理是在 TdT 酶的作用下，在基因组 DNA 断裂时暴露出的 3′-OH 末端掺入荧光素标记的 dUTP（FITC-12-dUTP），从而可以用荧光显微镜或流式细胞仪检测（FITC 激发 450-500 nm，发射 515-565 nm）。本试剂盒应用范围广，适用于石蜡组织切片，冰冻组织切片、细胞爬片、细胞涂片等的细胞凋亡检测。

**储存与运输：**

冰袋（wet ice）运输；

本试剂盒储存在-20℃，FITC-12-dUTP Labeling Mix 需避光储存于-20℃，有效期 12 个月。

**组成**

**实验前准备：**

| Component Number | Component | 50T | 100T |
|---|---|---|---|
| R1 | Recombinant TdT Enzyme | 50 μL | 2×50 μL |
| R2 | FITC-12-dUTP Labeling Mix | 250 μL | 2×250 μL |
| R3 | Equilibration Buffer | 5×1 mL | 10×1 mL |
| R4 | Proteinase K（200 μg/mL） | 1 mL | 2×1 mL |
| 产品说明书 | | 1 份 | |

1. PBS 磷酸盐缓冲液
2. 固定液：溶于 PBS 或其他缓冲体系的 4%多聚甲醛，pH 7.4
3. 破膜液：溶于 0.1%柠檬酸钠的 0.1% Triton X-100
4. 配制含 0.2% Triton X-100 的 PBS；配制含 0.1% Triton X-100 及 5 mg/mL BSA 的 PBS
5. 如需染核，需自备 DAPI（2 μg/mL）或 PI（1 μg/mL）
6. 如需阳性对照实验，需自备 DNase I
7. 如果用流式细胞仪，自备 PI 染液和 RNase A（DNase free）
8. 操作时请穿实验服，佩戴一次性手套。

**操作步骤：**

**一、样品准备**

**A. 石蜡包埋组织切片**

1. 室温下将石蜡组织切片放入二甲苯中浸泡 5-10 min，重复 2-3 次；然后无水乙醇浸泡 5 min，重复 2 次；最后用梯度乙醇（85%、75%、双蒸水）各浸

泡 1 次，每次 5 min；

2. 用 PBS 轻轻润洗切片，并去掉样本周围多余液体；使用组化笔沿组织外围轮廓画一个与组织间隔 2-3 mm 的小圈，便于下游通透性处理和平衡标记操

作；在实验过程中，切勿让样品干燥，处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润；

3. **配制 Proteinase K 工作液**：按 1：9 的比例，用 PBS 作为稀释液来稀释 Proteinase K（200 μg/mL）原液，使其终浓度为 20 μg/mL；

4. 每个样本上滴加 100 μL 上述 Proteinase K 工作液，使其被全部覆盖，37℃孵育 20 min；

**（注：Proteinase K 处理主要有助于组织和细胞后续步骤的染色试剂通透，其孵育时间过长过短都会影响后续标记效率，为得到更好的结**

**果，可以优化 Proteinase K 孵育的时间）**

5. 用 PBS 溶液浸润清洗样本 3 次，每次 5 min（**Proteinase K 需洗涤干净，否则会干扰后续的标记反应**），处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿

润；

6. **（可选步骤）**去掉样本上多余的液体，将适量破膜液（溶于 0.1%柠檬酸钠的 0.1% Triton X-100）滴加到组织上，充分浸润组织，室温处理 20

min；破膜处理完成后同样的用 PBS 溶液润洗样本 3 次，每次 5 min；处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

**B. 组织冰冻切片**

1. 将玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液（溶于 PBS）中固定，室温下孵育 10-15 min；

2. 片子从固定液中取出后，通风橱中自然晾干；

3. 将玻片放入纯水或 PBS 中润洗，去掉玻片上残存的固定液；

4. 用组化笔沿着组织外围轮廓画一个与组织间隔 2-3 mm 的小圈，便于下游通透性处理和平衡标记操作；在实验过程中，切勿让样品干燥，处理好的样

本放在湿盒中保持样本的湿润；

5. **配制 Proteinase K 工作液**：按 1：9 的比例，用 PBS 作为稀释液来稀释 Proteinase K（200 μg/mL）原液，使其终浓度为 20 μg/mL；

6. 每个样本上滴加 100 μL 上述 Proteinase K 工作液，使其被全部覆盖，室温孵育 10 min；

**（注：Proteinase K 处理主要有助于组织和细胞后续步骤的染色试剂通透，其孵育时间过长过短都会影响后续标记效率，未得到更好的结**

**果，可能需要优化 Proteinase K 孵育的时间）**

7. 用 PBS 溶液润洗样本 2-3 次，去掉多余液体（**Proteinase K 需洗涤干净，否则会干扰后续的标记反应**），处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿

润；

8. **（可选步骤）**将适量破膜液（溶于 0.1%柠檬酸钠的 0.1% Triton X-100）滴加到组织上，充分浸润组织，室温处理 20 min，破膜处理完成后同样的

用 PBS 溶液润洗样本，去掉

多余液体，处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

**C. 细胞爬片**

1. 在 Lab-Tek 载玻片小室（Chamber Slides）上培养贴壁细胞，在凋亡诱导处理之后，用 PBS 轻轻润洗 2 遍载玻片；
2. 向每个载玻片小室中加入适量的 4%多聚甲醛溶液（溶于 PBS）固定，室温下孵育 20 min；
3. 去掉固定液，加入 PBS 清洗 3 次，每次 5 min；
4. 每个样本浸于 0.2%配制于 PBS 中的 Triton X-100 溶液中，室温孵育 5 min 进行通透处理；
5. 在盛有 PBS 溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本 2-3 次；
6. 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

**D. 细胞涂片**

1. 以约 $2\times10^7$ 个细胞/mL 的浓度将细胞重悬于 PBS 中，吸取 50-100 μL 细胞悬液滴于防脱玻片上，使用一片洁净的载玻片轻柔涂开细胞悬液；
2. 将玻片浸入装有 4%新鲜配制于 PBS 中的多聚甲醛的染色缸中，固定细胞，在 4℃放置 25 min；
3. 将玻片浸入 PBS 中，室温放置 5 min 浸洗，重复一次；
4. 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体，用组化笔沿着细胞外围轮廓画一个小圈，便于下游透性处理和平衡标记操作，

在实验过程中，切勿让样

品干燥；

5. 每个样本浸于 0.2%配制于 PBS 中的 Triton X-100 溶液中，室温孵育 5 min 进行通透处理；
6. 在盛有 PBS 溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本 2-3 次；
7. 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体，处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

**二、DNase Ⅰ处理阳性对照实验（可选步骤）**

在样本通透处理后，用 DNase Ⅰ处理样本来准备阳性对照。

1. 将 100 μL 1×DNase Ⅰ Buffer（配制方法：取 10 μL 10×DNase Ⅰ Buffer，然后加入 90 μL 去离子水混匀）滴加到已通透的样本上，室温孵育 5

min；

2. 轻轻去掉多余液体，加入 100 μL 含有 DNase Ⅰ（20 U/mL）的工作液（配制方法：取 10 μL 10×DNase Ⅰ Buffer，然后加入 2 μL DNase Ⅰ，再加

入 88 μL 去离子水混匀），室温

孵育 10 min；

3. 轻轻去掉多余的液体，并将载玻片在装有 PBS 的染色缸中彻底洗 3-4 次。

**（注：阳性对照载玻片必须使用单独的染色缸，否则阳性对照载玻片上残留的 DNase Ⅰ可能会在实验载玻片上引入高背景）**

**三、标记与检测**

1. **平衡**：每个样本滴加 **50 μL Equilibration Buffer** 使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 10 min；

2. **标记液配制**：在冰上解冻 FITC-12-dUTP Labeling Mix 和 Equilibration Buffer，并按照 **Recombinant TdT enzyme：FITC-12-dUTP**

**Labeling Mix：Equilibration Buffer=1 μL：5 μL：50 μL（1：5：50）**比例混合足够用于所有实验的 **TdT 孵育缓冲液**，具体实验使用试剂

的体积可以根据玻片的大小进行适当等比例调整；

3. **阴性对照体系**：准备一份不含 Recombinant TdT enzyme 的对照 TdT 孵育缓冲液，用 $ddH_2O$ 替代；
4. **标记**：尽量去掉平衡的 Equilibration Buffer，然后在每份组织样本上加入 **56 μL TdT 孵育缓冲液**，在 37℃孵育 1 h；注意不能干片，载玻片要

避光；

5. 立即用 PBS 润洗组织样本，清洗 4 次，每次 5 min；
6. 用滤纸轻轻擦掉样本周围的 PBS 溶液；
7. **核染色**：样本在染色缸中染色，在黑暗中将载玻片浸入装有 PI 溶液或者 DAPI 溶液（用 PBS 新鲜配制并稀释）的染色缸，室温放置 8 min；
8. **封片**：样本染色完成后，用 PBS 清洗组织样本 3 次，每次 5 min，然后轻轻去掉多余液体，滴加**抗荧光淬灭封片剂封片**；
9. **镜检**：立即在荧光显微镜下分析样本，载玻片注意避光，PI/DAPI 能将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色/蓝色，只在凋亡的细胞核中才有 FITC-12-

dUTP 掺入而定位的绿色荧光。

**四、利用流式细胞术检测悬浮细胞**

1. 将待检测细胞用 PBS 清洗两次，4℃离心（500g）然后重悬在 500μLPBS 中；
2. **固定**：向样品中加入 5mL1%用 PBS 配制的多聚甲醛溶液，固定细胞，冰上放置 20 min；
3. 细胞在 4℃，300 g 离心 10min，去上清并用 5mLPBS 重悬两次，最后用 500μLPBS 重悬细胞；
4. **通透**：向样品中加入 5mL 冰上预冷的 70%乙醇，-20℃孵育 4h，通透细胞；

**（注：细胞也可用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液室温 5 min 进行通透）**

5. 细胞用 300g 离心 10min 后用 5mLPBS 重悬，再次离心后用 1mLPBS 重悬；
6. **平衡**：转移约 $2\times10^6$ 个细胞至 1.5 mL 的微量离心管，300 g 离心 10 min，去上清，并用 **80 μL Equilibration Buffer** 重悬，室温孵育 5 min；
7. **标记液配制**：在冰上解冻 FITC-12-dUTP Labeling Mix 和 Equilibration Buffer，并按照 **Recombinant TdT enzyme：FITC-12-dUTP**

**Labeling Mix：Equilibration Buffer=1 μL：5 μL：50 μL（1：5：50）**比例混合足够用于所有实验和可选阳性对照反应的 **TdT 孵育缓冲**

**液**；

8. **标记**：细胞用 300g 离心 10min，去上清将沉淀重悬在 **56μLTdT 孵育缓冲液**中，37℃孵育 1h，避光。每隔 15min 用微量移液器轻轻重悬细胞；
9. 反应完成后加入 1mL20mM EDTA 终止反应，用微量移液器轻柔混匀；
10. 300g 离心 10min，去上清并将沉淀重悬在 1 mL 用 PBS 配制的 0.1% Triton X-100 溶液中，其中含 5 mg/mL BSA，重复洗 2 次；

11. **核染色**：300g 离心 10min，去上清并将细胞沉淀重悬在 0.5mLPI 溶液中，其中包含 250μg 无 DNA 酶的 RNase A，在黑暗中室温孵育细胞 30 min；
12. **上机检测**：流式细胞仪分析细胞，PI 能将凋亡和未凋亡的细胞均染成红色，只在凋亡的细胞核中才有 FITC-12-dUTP 掺入而定位的绿色荧光。