

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒

In Situ Cell Death Detection Kit, POD

货号: bs-8004-10

规格: 10Tests

保存: -20°C 避光保存。

产品简介:

凋亡是许多正常的生理过程所必需的, 包括免疫系统的成熟和作用机制、组织器官和肢体的发生、神经系统的发生等过程。在许多病理条件下, 凋亡机制的调节失衡起很重要的作用, 包括出血、中风、心脏病、癌症、艾滋病、自身免疫缺损和中枢神经系统的退行性变等。在癌基因的研究方面, 由于细胞凋亡可由抗癌药物、放射及高热等启动, 并且肿瘤细胞具有由于一些癌基因表达即能启动凋亡的内在特性, 因此细胞凋亡已引起人们的广泛重视。

检测凋亡细胞的方法有数种。细胞在发生凋亡时, 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。细胞凋亡时抽提 DNA 进行电泳检测, 可以发现 180-200bp 的 DNA 梯形带。但是, 这种方法既不能检测单个细胞水平的凋亡, 又不能提供细胞发生凋亡所处的组织位置和细胞分化状态等方面的信息。这一切可以由凋亡的原位酶标记方法来完成。基因组 DNA 断裂时, 暴露的 3'-OH 可以在末端脱氧核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 的催化下加上荧光素 (FITC) 标记的 dUTP (fluorescein-dUTP), 从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测, 这就是 TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) 法检测细胞凋亡的原理。

试剂盒内容:

| 试剂 | 名称 | 体积 | 保存条件 |
|------|----------------------------|-------|----------------|
| 试剂 1 | TdT 酶浓缩溶液, Enzyme Solution | 50ul | -15°C to -25°C |
| 试剂 2 | 荧光标记液, Lable Solution | 500ul | -15°C to -25°C |
| 试剂 3 | 转化剂-POD, Converter-POD | 700ul | 2-8°C |

配制 TUNEL 检测液 (Tunel reaction mixture)

参考下表配制适当量的 TUNEL 检测液, 需充分混匀。

| | 1 个样品 | 5 个样品 | 10 个样品 |
|-----------------------------------|-------|-------|--------|
| 试剂 1: Enzyme Solution | 5ul | 25ul | 50ul |
| 试剂 2: Lable Solution | 45ul | 225ul | 450ul |
| Tunel 检测液: Tunel reaction mixture | 50ul | 250ul | 500ul |

注 1: 配制好的 TUNEL 检测液必须一次使用完毕, 不能冻存。

注 2: 剩余的 50ul 试剂 2 (Lable Solution) 用于做为阴性对照。

实验所需其他试剂：

- (1) 非石蜡切片
洗液：磷酸盐缓冲液 (1×PBS, pH7.4) (*Bioss, C01-01001*)
固定液：4%多聚甲醛 (*Bioss, C01-06002*)
渗透液：0.1% Triton X-100 (*Bioss, C03-03003*)

- (2) 石蜡切片
二甲苯
梯度乙醇 (100%、95%、90%、80%、70%)
洗液：磷酸盐缓冲液 (1×PBS, pH7.4) (*Bioss, C01-01001*)
蛋白酶 K (*Bioss, C6013*, 浓度 20mg/ml, 推荐工作浓度 20 μg/ml)

- (3) 根据需要选择
胃酶溶液 (0.25%-0.5%溶于 HCl, pH2) 或胰酶
0.1M 枸橼酸缓冲液 (pH6) (*Bioss, C02-02002*)
阻断液：0.3% H₂O₂ 甲醇溶液
DAB 显色液 (*Bioss, C-0010*)
苏木素染色液 (*Bioss, S0145*)
抗荧光淬灭封片液 (*Bioss, C02-04003*)
中性树胶封片剂 (*Bioss, C-0073*)

实验操作步骤：

1. 对于贴壁细胞或细胞涂片
 - a. PBS 洗涤一次。
 - b. 如果细胞贴得不牢，可以干燥样品使细胞贴得更牢。
 - c. 用 4%多聚甲醛固定细胞 30-60 分钟。
 - d. 用 PBS 洗涤一次。
 - e. 加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS，冰浴孵育 2 分钟。
 - f. 在样品上加 50μl TUNEL 检测液，37°C避光孵育 60 分钟。注意：孵育时需注意保持湿润，以减少 TUNEL 检测液的蒸发。
 - g. PBS 洗涤 3 次。
 - h. 用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。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)。

2. 对于悬浮细胞或细胞悬液
 - a. 收集细胞(不超过 200 万细胞)，PBS 洗涤一次。
 - b. 用 4%多聚甲醛固定细胞 30-60 分钟。为防止细胞聚集成团，宜在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动的同时进行固定。
 - c. 用 PBS 洗涤一次。
 - d. 用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 重悬细胞，冰浴孵育 2 分钟。
 - e. 加入 50μl TUNEL 检测液，37°C避光孵育 60 分钟。
 - f. PBS 洗涤 2 次。
 - g. 用 250-500μl PBS 悬浮。
 - h. 此时可以用流式细胞仪进行检测或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)。

3. 对于石蜡切片
 - a. 二甲苯中脱蜡 5-10 分钟。换用新鲜的二甲苯，再脱蜡 5-10 分钟。无水乙醇 5 分钟。90%乙醇 2 分钟。70%乙醇 2 分钟，蒸馏水 2 分钟。
 - b. 滴加 20 μ g/ml 不含 DNase 的蛋白酶 K，20-37 $^{\circ}$ C 作用 15-30 分钟(不同组织的最佳作用温度和时间需自行摸索)。
 - c. PBS 洗涤 3 次。注意：这一步必须把蛋白酶 K 洗涤干净，否则会严重干扰后续标记反应。
 - d. 在样品上加 50 μ l TUNEL 检测液，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 分钟。注意：孵育时需注意保持湿润，以尽量减少 TUNEL 检测液的蒸发。
 - e. PBS 洗涤 3 次。
 - f. 用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。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. 对于冷冻切片
 - a. 用 4%多聚甲醛固定细胞 30-60 分钟。
 - b. PBS 洗涤 2 次，每次 10 分钟。
 - c. 加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS，冰浴孵育 2 分钟。
 - d. 在样品上加 50 μ l TUNEL 检测液，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 分钟。注意：孵育时需注意保持湿润，以尽量减少 TUNEL 检测液的蒸发。
 - e. PBS 洗涤 3 次。
 - f. 用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。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)。

5. 对于转化剂-POD (Converter-POD) 的使用

Tunel 检测液中的荧光素可以被偶联过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 的抗荧光素抗体标记，在 POD 底物二氨基联苯胺 (DAB) 的存在下，产生很强的颜色反应 (呈棕色)，从而同荧光观测一样，同样特异准确的定位凋亡细胞，而且在普通光学显微镜下即可观察和计数。

对于细胞爬片、石蜡切片、冰冻切片，加入 Tunel 检测液后，操作如下：

 - a. PBS 洗涤 2 次，每次 10 分钟。
 - b. 0.3% H₂O₂ 甲醇溶液，室温阻断 10min。
 - c. PBS 洗涤 2 次，每次 10 分钟。
 - d. 加入适量 Converter-POD，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。
 - e. PBS 洗涤 3 次。
 - f. 用 DAB 显色液显色。
 - g. 可用苏木素染色液对细胞核进行复染。正常细胞染成蓝色，凋亡细胞染成棕黄色。
 - h. 常规脱水，透明，中性树脂封片。

常见问题分析：

1. 出现非特异性荧光标记
 - a. 有些细胞或组织，例如平滑肌细胞或组织，nuclease 或 polymerase 的酶活性水平较高，易导致出现非特异性的荧光标记。解决方法是，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。
 - b. 使用了不适当的固定液，例如一些酸性固定液，导致出现假阳性。建议采用推荐的固定液。

- c. TUNEL 检测反应时间过长，或 TUNEL 检测反应过程中反应液渗漏，细胞或组织表面不能保持湿润，也可能出现非特异性荧光。注意控制反应时间，并确保 TUNEL 检测反应液能很好地覆盖样品。
2. 荧光背景很高
- a. 支原体污染。请使用支原体染色检测试剂盒检测是否为支原体污染。
 - b. 高速分裂和增殖的细胞，有时也会出现细胞核中的 DNA 断裂。
 - c. TUNEL 反应过强。可以用试剂盒提供的 TdT 酶稀释液稀释 TdT 酶 2-5 倍后再按照说明书操作。稀释后的 TdT 酶需当日使用。
 - d. 红细胞中血红蛋白导致的自发荧光产生严重干扰。此时宜选择其它细胞凋亡检测试剂盒。
3. 标记效率低
- a. 使用乙醇或甲醇固定会导致标记的效率较低。
 - b. 固定时间过长，导致交联程度过高。此时宜减少固定时间。
 - c. 荧光淬灭。Fluorescence 在普通光照 10 分钟就会严重淬灭。解决方法是需注意避光操作。