

分步法TUNEL凋亡试剂盒（绿光）

货号：PN0048

实验原理

TUNEL (TdT mediated dUTP Nick End Labeling) 技术可对组织或细胞中凋亡小体或单个凋亡细胞进行染色，能准确反映细胞凋亡最典型的生物化学和形态特征。凋亡细胞内的内源性核酸内切酶被激活而将自身染色体DNA切断成产生大量的3-OH 末端片段，利用这一特点，用脱氧核苷酸末端转移酶 (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 将标有标记物 (dUTP-生物素) 的脱氧核苷酸转移到3-OH 末端，再与HRP标记的链酶亲和素以及TYR488结合后，从而将凋亡信号标记出来。

本试剂盒应用范围广，分步法适用于白光TUNEL显色，也适用于荧光底物显色。可以用于检测冷冻或石蜡切片中的细胞凋亡情况，也可以检测培养的贴壁细胞或悬浮细胞的凋亡情况。

储存与运输

冰袋 (wetice) 运输；本试剂盒储存在-20℃, 有效期12个月。

试剂组成

试剂名称	规格 (50T/100T)	储存条件
Proteinase K	100 μ l/200u1	-20℃
5xEquilibration Buffer	1 mL/2ml	-20℃
dUTP-生物素	250 μ L/500u1	-20℃
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT	50 μ L/100u1	-20℃
HRP Conjugated Streptavidin	50u1/100u1	-20℃
TSA Buffer	5ml/10ml	-20℃
TYR-488	10u1/20u1	-20℃
DAPI	5 mL/10 ml	-20℃

试剂配制

Tunel孵育液：

试剂名称	使用比例
H ₂ O	34 μ L
5x Equilibration Buffer	10 μ L
DUTP-生物素	5 μ L
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT	1 μ L



一、样品准备

A. 石蜡包埋组织切片

1. 室温下将组织石蜡切片放入二甲苯中浸泡5-10min，重复2-3次；然后无水乙醇浸泡5min，重复2次；最后用梯度乙醇（85%、75%、双蒸水）各浸泡1次，每次5min；
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2-3mm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1:99的比例，用PBS作为稀释液来稀Proteinase K作为工作液；
4. 每个样本上滴加50 μ L上述 Proteinase K工作液，使其被全部覆盖，37 $^{\circ}$ C孵育20min；
5. 用PBS溶液浸润清洗样本3次，每次3min（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10-15min；
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2-3mm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1:99的比例，PBS作为稀释液来稀释Proteinase K作为工作液；
6. 每个样本上滴加50 μ L上述Proteinase K工作液，使其被全部覆盖，37 $^{\circ}$ C孵育10min；
7. 用PBS溶液浸润清洗样本3次，每次3min（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3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20min；
3. 去掉固定液，加入PBS清洗3次，每次3min；
4. 每个样本浸于破膜液中，室温孵育5min进行通透处理（注意：推荐用Proteinase K工作液消化，37 $^{\circ}$ C处理10min左右，视细胞状态调整。若细胞易掉片则建议选择用破膜液处理）；
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

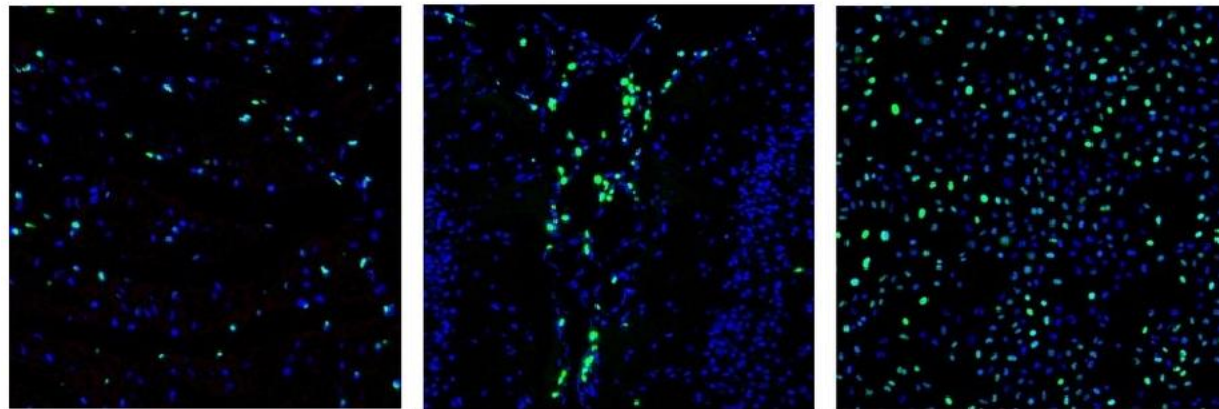
1. 以约 2×10^7 个细胞/mL的浓度将细胞重悬于PBS中，吸取50-100 μ L细胞悬液滴于防脱玻片上，使用一片洁净的载玻片轻柔涂开细胞悬液；
2. 将玻片浸入装有4%新鲜配制于PBS中的多聚甲醛的染色缸中，固定细胞，在4 $^{\circ}$ C放置25min；
3. 将玻片浸入PBS中，室温放置5min浸洗，重复一次；
4. 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体，用组化笔沿着细胞外围轮廓画一个小圈，便于下游透性处理和平衡标记操作，在实验过程中，切勿让样品干燥；
5. 每个样本浸于破膜液中，室温孵育5min进行通透处理（注意：推荐用2-20 μ g/mL的Proteinase K工作液消化，37 $^{\circ}$ C处理10min左右，视细胞状态调整。若细胞易掉片则建议选择用破膜液处理）；
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、标记与检测

1. 标记液配制：按照比例配制Tunel 孵育液；
2. 标记：在每份组织样本上加入上述配制好的孵育液 50 μ L，在37 $^{\circ}$ C孵育2-3 h； 注意不能干片，载玻片要避免光；
3. 立即用 PBS 润洗组织样本，清洗3次，每次5 min；
4. 用滤纸轻轻擦掉样本周围的 PBS 溶液；
5. 配制HRP标记液：用PBST或者PBS 按1:200配制，每张切片滴加50ul左右，在37 $^{\circ}$ C孵育1 h；注意不能干片，载玻片要避免光；
6. 立即用 PBS 润洗组织样本，清洗3次，每次5 min；
7. 用TSA buffer稀释TYR 488，稀释比1:1500-2000，室温孵育30 min后，PBS润洗组织样本，清洗3次，每次5 min；
8. 核染色：在每份组织样本上加入50 μ L DAPI，室温孵育1-3 min；
9. 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，封片；
10. 镜检：立即在荧光显微镜下分析样本，载玻片注意避光， DAPI能将凋亡和未凋亡的细胞核着色。

结果图例



心肌细胞

脑梗

细胞爬片

结果说明：

凋亡的细胞染色体断裂是渐进的。染色体DNA 首先在内源性的核酸水解酶的作用下降解成较大的片段，之后部分染色体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，形成较小片段的核小体DNA 多聚体。因此在细胞凋亡晚期，DNA 会被降解成更小的片段，断裂的基因组DNA 上暴露出大量的3'-OH 末端，更容易被TDT酶复合物检测。因此凋亡早期绿光信号较弱，细胞核也相对完整，凋亡信号与细胞核基本重合。细胞凋亡晚期，DNA 会被降解成较小的片段，DAPI 着色较浅或者几乎没有，此时也暴露大量3'-OH末端，结合更多的TDT绿光信号复合物，所以到晚期可能出现，只有很强的绿光信号， DAPI光很弱或者没有的结果。

正常的心、肝、肺、肾、脑等组织一般没有明显凋亡信号，如做了其他处理诱导组织发生凋亡则会出现大量凋亡信。（如心梗处、脑梗处凋亡信号会很明显肿瘤的坏死处表达也会很强）

注意事项：

1. 蛋白酶K处理时间不能过久（植物，细胞一般5min 动物组织20min），否则会导致细胞核受损染不上DAPI，处理时间太短会导致tunel 信号不明显或无法标记完整。
2. 蛋白酶k处理后需要反复冲洗干净，避免出现绿光片状不均匀的影响表达的观察。
3. 试剂盒使用后及时放回常用保存温度，避免影响效价。
4. 孵育温度保持稳定，孵育完冲洗干净，避免结果不均匀。

本产品仅供科研用途，不用于临床诊断

