Vazyme

www.vazyme.com

TUNEL FITC Apoptosis Detection Kit

A111

Vazyme

Vazyme Biotech Co., Ltd

Web: www.vazyme.com
Tel: 400-600-9335
Sales: sales@vazyme.com
Support: support@vazyme.com
Service: service@vazyme.com

企业已通过ISO 9001:2015
国际质量管理体系认证

Vazyme

www.vazyme.com

Vazyme biotech co., ltd.

使用说明书

Version 7.2

Vazyme

目 录 Contents

01/产品概述 …… 02
02/产品组分 …… 02
03/保存条件 …… 02
04/自备材料 …… 02
05/实验流程概要 …… 03
06/组织切片/贴壁细胞使用方案 …… 04
06-1/样本预处理 …… 04
06-2/阳性处理 …… 05
06-3/标记及检测 …… 06
07/悬浮细胞使用方案 …… 07
08/常见问题及解决方案 …… 08
09/附录 …… 09

01/产品概述

细胞凋亡时，细胞内特异性核酸内切酶活化，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′-羟基(3′-OH)末端可以在末端脱氧核糖核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase，TdT)的作用下结合荧光素-12-脱氧三磷酸尿苷(FITC-12-dUTP)，FITC-12-dUTP标记的DNA可以用荧光显微镜直接观察或者用流式细胞仪定量分析，从而反映细胞凋亡水平。

本试剂盒对标记反应进行了优化，采用最佳比例的荧光素标记和未标记的dNTP进行3'-OH末端的核苷酸掺入，使得同一个断裂的DNA片段末端可以形成更长的“标记尾巴”，该“标记尾巴”减少了相邻掺入dNTP上标记基团的空间位阻，增加了每个断裂片段末端的荧光基团数目，降低了荧光基团相邻后可能造成的聚集和淬灭，从而提高检测灵敏度，减少非特异性反应。

02/产品组分

组 分	A111-01 (20 rxn)	A111-02 (50 rxn)	A111-03 (100 rxn)
5 × Equilibration Buffer	1.25 ml	2 × 1.25 ml	3 × 1.25 ml
FITC-12-dUTP Labeling Mix	100 μl	250 μl	2 × 250 μl
Recombinant TdT Enzyme	20 μl	50 μl	2 × 50 μl
Proteinase K (2 mg/ml)	40 μl	100 μl	2 × 100 μl
DNase I (2 U/μl)	5 μl	13 μl	25 μl
10 × DNase I Buffer	100 μl	260 μl	500 μl

03/保存条件

-20℃保存；

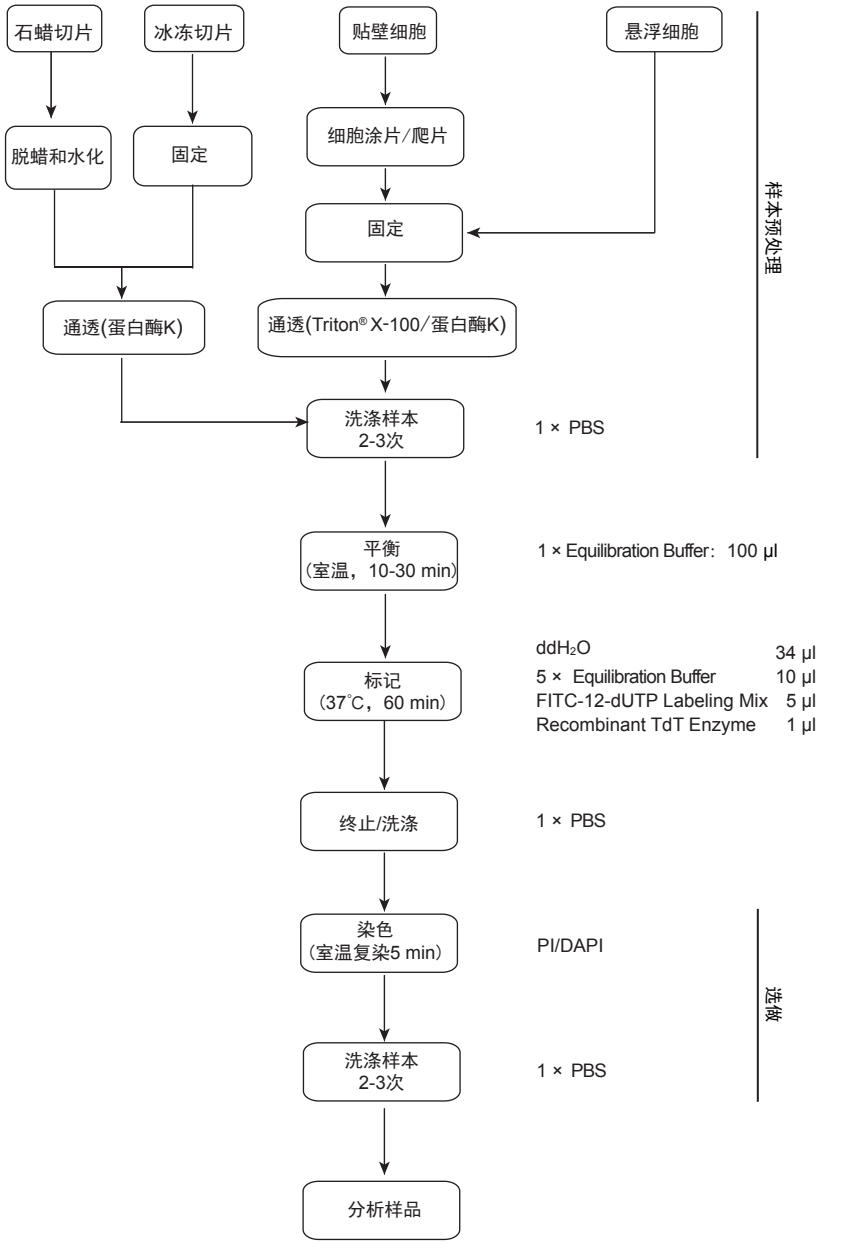
FITC-12-dUTP Labeling Mix：-20℃避光保存。

04/自备材料

试剂：4%多聚甲醛 、DAPI/PI 、Triton® X-100 、PBS 、无水乙醇。

其他材料：细胞爬片/载玻片、湿盒。

05/实验流程概要



图一：实验流程概要

06/组织切片/贴壁细胞使用方案

请在实验前仔细阅读此操作说明，本使用方案适用于石蜡包埋组织切片、冰冻组织切片、贴壁细胞凋亡检测。各样本请严格按照其操作流程进行，如需进行悬浮细胞检测，请参照07/悬浮细胞使用方案。

06–1/样本预处理

◇石蜡包埋组织切片

1.室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片2次，每次5 min，以彻底脱掉石蜡。

▲二甲苯为有毒易挥发物质，请在通风橱中进行。

2.室温下用无水乙醇浸泡润洗切片2次，每次5 min。

3.室温下用梯度乙醇 (90%、80%、70%)各浸泡润洗1次，每次3 min。

4.用1 × PBS浸泡润洗切片，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围多余的液体。

▲可用石蜡笔或疏水笔在样品周围描绘样品分布的轮廓，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湿润。

5.按1:100的比例，将2 mg/ml的Proteinase K溶液用1 × PBS稀释，使其终浓度为20 μg/ml。每个样本上滴加100 μl稀释好的Proteinase K溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育20 min。

▲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，过短则可能造成通透处理不充分，影响标记效率。为得到最好的结果，可能需要优化Proteinase K的孵育时间。

6.用1 × PBS溶液浸泡润洗样本2~3次，每次3~5 min。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。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

◇冰冻组织切片

1.将冰冻切片置于片架上，室温晾干20 min。

2.将载玻片浸没在4%多聚甲醛溶液 (溶于1 × PBS)中，室温固定30 min。

3.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。

4.将载玻片浸没在1 × PBS溶液中清洗两次，每次5 min。

5.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。

▲可用石蜡笔或疏水笔在样品周围描绘样品分布的轮廓，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湿润。

6.按1:100的比例，将2 mg/ml的Proteinase K溶液用1 × PBS稀释，使其终浓度为20 μg/ml。每个样本上滴加100 μl稀释好的Proteinase K溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育10 min。

▲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，过短则可能造成通透处理不充分，影响标记效率。为得到最好的结果，可能需要优化Proteinase K的孵育时间。

7.用1 × PBS溶液润洗样本2~3次，每次3~5 min。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。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

Vazyme
www.vazyme.com

◇细胞样品

细胞爬片的准备：

在Lab-Tek载玻片小室或TC处理的细胞爬片上培养贴壁细胞。在凋亡诱导处理之后，用PBS漂洗载玻片2次，进入后续实验。

细胞涂片的准备：

以2 × 10^6 cells/ml的浓度将细胞重悬于1 × PBS。吸取50~100 μl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，进入后续实验。

1.将爬片/涂片浸入装有4%多聚甲醛(新鲜配制于1 × PBS)的染色缸中，在4℃放置25 min，进行细胞固定。

2.将爬片/涂片浸没在1 × PBS溶液中清洗两次，每次室温放置5 min。

3.轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干爬片/涂片上样本周围的液体。

▲可用石蜡笔或疏水笔在样品周围描绘样品分布的轮廓，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湿润。

4.按1:100的比例，将2 mg/ml的Proteinase K溶液用1 × PBS稀释，使其终浓度为20 μg/ml。在每个样本上滴加100 μl稀释好的Proteinase K溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育5 min；也可浸于用1 × PBS配置的浓度为0.2% Triton®X-100溶液中，室温孵育5 min进行通透处理。

▲细胞爬片/涂片在处理时较易脱片，建议使用0. 2~0.5%的Triton®X-100溶液进行通透，以避免通透引起的脱片。

▲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，过短则可能造成通透处理不充分，影响标记效率。为得到最好的结果，可能需要优化Proteinase K孵育的时间。

5.用1 × PBS溶液润洗样本2~3次。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。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

06–2/阳性处理(仅阳性对照进行此步骤，其他样品直接进行06–3/标记及检测)

样本通透处理之后，可通过DNase I处理样本用来准备阳性对照。

▲DNase I处理固定的细胞会引起染色体DNA的断裂，产生许多可标记的DNA 3'末端。以下操作流程通常会引起被处理的大多数细胞显现绿色荧光。

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

▲每个样本需要准备200 μl 1 × DNase I Buffer。

2.滴加100 μl 1 × DNase I Buffer到已通透的样本上，室温平衡5 min。

3.用1 × DNase I Buffer 以1:100稀释DNase I (2 U/μl)，使其为终浓度20 U/ml的工作液。

4.轻轻吸掉多余液体，加入100 μl浓度为20 U/ml DNase I工作液，室温孵育10 min。

5.轻轻吸掉多余液体，并将载玻片/爬片在装有1 × PBS的染色缸中彻底浸泡润洗2~3次。

▲阳性对照载玻片必须使用单独的染色缸。阳性对照载玻片/爬片上残余的DNase I可能会在实验组中造成假阳性的错误信号。

06–3/标记及检测

1.按1:5的比例用ddH_2O将5 × Equilibration Buffer稀释成1 × Equilibration Buffer。

2.滴加100 μl 1 × Equilibration Buffer使其全部覆盖待检样本区域，室温平衡10~30 min。

3.平衡期间在避光条件下按照下表配制标记液。

组分	阴性对照	阳性对照/样品
ddH_2O	35 μl	34 μl
5 × Equilibration Buffer	10 μl	10 μl
FITC-12-dUTP Labeling Mix	5 μl	5 μl
Recombinant TdT Enzyme	0 μl	1 μl

▲对于面积小于5 cm^2的反应，所需体积是50 μl，用50 μl乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需TdT孵育缓冲液的总体积。对于表面积更大的样本，可成比例地增加试剂体积。

4.平衡结束后，用吸水纸吸掉1 × Equilibration Buffer，然后在面积为5 cm^2的样本上滴加50 μl TdT孵育缓冲液。

▲不要让样本干掉。使用吸水纸时，吸水纸不要接触细胞或者组织。载玻片/爬片需要避光处理。

5.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均匀分布。在湿盒的底部放上用水浸湿的纸巾。将载玻片置于湿盒内，37℃孵育60 min。

▲可折起封口膜的边缘以便于移除和操作，湿盒用锡箔纸包裹避光。

6.轻轻去掉多余液体，用新鲜的1 × PBS溶液清洗2次，每次室温孵育5 min。

▲为了降低背景，样本在用1 × PBS清洗后，可再用含0.1% Triton®X-100和5 mg/ml BSA的PBS洗3次，每次5 min，这样可将游离的未反应标记物清除干净。

7.用滤纸轻轻擦掉样本周围及背面的1 × PBS溶液。

8.用1 × PBS新鲜配制的浓度为1 μg/ml的PI溶液或者用1 × PBS新鲜配制的浓度为2 μg/ml的DAPI溶液在黑暗中对样本进行复染，染色时室温放置5 min。

9.洗涤样本，将载玻片浸入1 × PBS溶液中清洗3次，每次室温放置5 min。

10.轻轻吸掉多余液体，并向样本区域加100 μl用 1 ×PBS配制的20%甘油保持样本湿润。

11.立即在荧光显微镜下分析样本，用标准的荧光过滤装置在520±20 nm的荧光下观察绿色荧光；在>620 nm下观察PI的红色荧光，或在460 nm观察DAPI的蓝色荧光。

▲如有必要，可以将样本进行封片处理后，4℃避光过夜保存。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掺入而产生的绿色荧光。

07/悬浮细胞使用方案

1.将3~5 × 10^6个细胞用1 × PBS洗2次，每次4℃ 300 g离心5 min。然后用0.5 ml 1 × PBS重悬。

2.加入5 ml 配制于1 × PBS浓度为1%的多聚甲醛溶液，4℃孵育20 min进行细胞固定。

3.4℃ 300 g离心5 min，弃上清，用5 ml 1 × PBS重悬细胞。

4.重复离心并用0.5 ml 1 × PBS重悬细胞。

5.加入5 ml配制于1 × PBS浓度为0.2% Triton® X-100溶液，室温条件下通透5 min，或者加入5 ml冰上预冷的70%乙醇，在-20℃ 孵育4 h。

▲细胞能在70%乙醇中-20℃的条件下保存一周。

▲通透后的细胞折光率会下降，细胞浑浊不易观察，操作过程中应小心操作，避免细胞丢失。

6.4℃ 300 g离心5 min，弃上清，用5 ml 1 × PBS重悬细胞。重复离心并用1 ml 1 × PBS重悬细胞。

7.转移2 × 10^6个细胞至新的1.5 ml离心管。

8.4℃ 300 g离心5 min，弃上清，并用1 × Equilibration Buffer (用ddH_2O按1∶5的比例稀释5 × Equilibration Buffer)重悬细胞。室温孵育5 min。

9.在平衡细胞期间，配制标记液。冰上融解FITC-12-dUTP标记混合物，并且依照下表配制标记液。

▲对于2 × 10^6个细胞的一个标准反应，所需体积是50 μl。用50 μl乘上反应数目来确定所需TdT孵育缓冲液的总体积。

组分	阴性对照	阳性对照/样品
ddH_2O	35 μl	34 μl
5 × Equilibration Buffer	10 μl	10 μl
FITC-12-dUTP Labeling Mix	5 μl	5 μl
Recombinant TdT Enzyme	0 μl	1 μl

10.4℃ 300 g离心5 min，弃上清并用50 μl TdT孵育缓冲液重悬细胞。37℃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。

11.加入1 ml 20 mM EDTA终止反应，用移液器轻柔混匀。

12.4℃ 300 g离心5 min，弃上清，用1 ml配制于1 × PBS中的0.1%Triton® X-100重悬细胞，其中含5 mg/ml BSA。重复一次，共洗两次。

13.4℃ 300 g离心5 min，弃上清，用0.5 ml配制于1 × PBS中的5 μg/ml PI溶液重悬细胞。

14.在黑暗中室温孵育细胞30 min。

15.用流式细胞仪分析细胞。或用标准的荧光过滤装置在520±20 nm的荧光下观察FITC的绿色荧光，在>620 nm的的荧光下观察PI的红色荧光。

▲ PI将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色。只有凋亡的细胞核中有FITC-12-dUTP掺入才会产生绿色荧光。

08/常见问题及解决方案

◇高背景（如未凋亡细胞的强绿色荧光背景）

非特异性掺入FITC-12-dUTP。

处理方法：在操作过程中保持细胞湿润；标记反应完成，载玻片在用PBS洗一遍之后，可再用含0.1% Triton® X-100和5 mg/ml BSA的PBS洗3次，每次5 min。

◇阳性细胞数量少

通透不充分，可通过调整蛋白酶K或Triton® X-100的浓度和孵育时间优化通透步骤。

◇组织切片从载玻片上脱落

组织切片粘附之前的包被不充分。在展片之前，用3-氨丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyl triethoxysilane，TESPA；Sigma Cat.# A3648)包被显微镜载玻片比多聚赖氨酸 (poly-L-lysine)效果更好。

◇显微镜或流式细胞仪分析只剩下很少的细胞

在操作过程中丢失大量细胞。

①可以提高起始的细胞量；

②在制备细胞悬液时，离心过程中用含1% BSA的PBS洗细胞。

◇标记率低

如果以乙醇或甲醇固定的样本则标记效率较低（因为在固定时染色质未能与蛋白质交联，而在操作中丢失），应用溶于1 × PBS中的4%多聚甲醛固定或福尔马林或戊二醛固定。过度的固定导致与蛋白过度交联也会导致标记效率低，可以适当缩短固定时间；或用溶于1 × PBS的2%多聚甲醛固定。

09/附录

◇ **多聚赖氨酸包被的载玻片准备：**

吸取50~100 μl 0.01%(W/V)多聚赖氨酸水溶液(1:10用ddH_2O稀释)滴至预清洗过的玻璃表面。在将要用于固定细胞的区域将多聚赖氨酸溶液涂散为薄层。待载玻片晾干之后迅速用去离子水漂洗，然后让包被后的载玻片在空气中静置30~60 min，直至晾干。包埋后的载玻片能在室温储存3个月。

◇ **缓冲液及溶液组分**

1 × PBS(pH 7.4)

137 mM NaCl

2.68 mM KCl

1.47 mM KH_2PO_4

8.1 mM Na_2HPO_4

PI 溶液(1 mg/ml)

称取10 mg PI溶于10 ml PBS中；0~4℃避光储存；使用时适量稀释。

DAPI 溶液(1 mg/ml)

称取10 mg DAPI溶于10 ml PBS中；0~4℃避光储存；使用时适量稀释。

DNA酶 I(DNase I)缓冲液

40 mM Tris-HCl (pH 7.9)

10 mM NaCl

6 mM $MgCl_2$

10 mM $CaCl_2$

4%多聚甲醛溶液

在通风橱中称取4 g多聚甲醛，加1 × PBS至100 ml。装于密闭容器中在65℃水浴加热溶解2 h。4℃储存溶液，在4℃至少可稳定储存两周。

10% Triton®X-100溶液

在烧杯中混合85 ml ddH_2O和10 ml Triton® X-100溶液，磁力搅拌混匀。用水定容至100 ml。