

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (FITC)

产品编号:

FY600017-20T

FY600017-50T

存储条件:

-20 °C避光保存, 有效期12个月或更久;

若频繁使用可在4°C避光保存3个月。

避免反复冻融。

产品组分:

编号	名称	20T	50T
A	rTdT酶	20 μl	50 μl
B	标记混合物	1000 μl	2500 μl

产品简介:

细胞在发生凋亡时, 细胞内激活的DNA内切酶会切断核小体间的基因组DNA, DNA会被降解成为约180 bp-200 bp 的片段, 而正常或增殖细胞很少发生DNA断裂。脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT 酶) 把FITC标记的dUTP标记到断裂DNA片段的3'-OH 末端, 从而使DNA片段标记上绿色荧光。然后进行荧光显微镜或流式细胞仪检测, 这个方法被称为TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法细胞凋亡检测。

本产品能够在DNA碎片末端标记上千bp的核苷酸, 因而具有极高的灵敏性。可检测的样本类型有: 石蜡包埋组织切片, 冰冻切片, 贴壁细胞和悬浮细胞。检测方法可以使用荧光显微镜或者流式细胞仪。

自备耗材和设备:

1 ml 移液器

200 μl 移液器

20 μl 移液器

15 ml离心管

流式细胞仪

荧光显微镜

PBS

PI或DAPI染色液 (选做)

蛋白酶K (选做)

适用实验与操作过程:

1. 样本处理:

弗元 (上海) 生物科技有限公司

1.1 悬浮细胞 (细胞悬液)

- 收集细胞, PBS 洗涤一次。
- 含 1% 甲醛的 PBS 或者 4% 多聚甲醛室温固定 30 分钟。摇床轻轻晃动防止细胞成团。
- PBS 再洗涤 1 次。
- 含 0.2% Triton X-100 的 PBS 重悬细胞, 室温孵育 5 分钟。

1.2 贴壁细胞 (细胞爬片/涂片)

- PBS 洗涤细胞 1 次。
- 含 1% 甲醛的 PBS 4% 多聚甲醛室温固定 30 分钟。
- PBS 洗涤 1 次。
- 用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 室温孵育 5 分钟。

1.3 冰冻切片

- 4% 多聚甲醛室温固定 60 分钟。
- PBS 洗涤 2 次, 每次 5 分钟。
- 含 0.5% Triton X-100 的 PBS, 室温孵育 5 分钟。或者用 20 μg/ml 的蛋白酶 K 室温作用 15-30 分钟 (若用蛋白酶 K 通透处理, 后续需用 PBS 洗涤 2-3 次, 每次 5 分钟, 将蛋白酶 K 漂洗干净)。

1.4 石蜡切片

- 脱蜡: 二甲苯脱蜡 2-3 次, 每次 5-10 分钟。
- 复水: 用无水乙醇, 90% 乙醇, 70% 乙醇, 蒸馏水依次浸泡, 每次 2-5 分钟。
- 滴加 20 μg/ml 蛋白酶 K 室温处理 15-30 分钟。
- PBS 洗涤 2-3 次, 每次 5 分钟, 将蛋白酶 K 漂洗干净。

2. 配制 TUNEL 反应体系:

	1 个样本	N 个样本
标记混合物	50 μl	50×N μl
rTdT 酶	1 μl	1×N μl
总体积	51 μl	51×N μl

3. 流式细胞仪检测悬浮细胞或者细胞悬液:

- PBS 洗涤细胞 1-2 次, 每次 5 分钟。细胞沉淀中加入 TUNEL 反应液 50 μl。37°C 避光反应 60 分钟。
- PBS 洗涤 2-3 次, 每次 5 分钟。
- 选作: 加 PI 或者 DAPI 染色液 1 μl/ml, 染细胞核。
- 补加 500 μl PBS, 流式细胞仪检测。

4. 荧光显微镜检测细胞涂片或者细胞爬片或者组织切片:

- PBS 洗涤 1-2 次, 每次 5 分钟。
- 加入 TUNEL 反应液 50 μl。37°C 避光反应 60 分钟。

- c) PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
- d) 选作：加 PI 或者 DAPI 染色液 1 μ l/ml，染细胞核。
- e) 荧光显微镜下观测并拍照。

注意事项与常见问题：

1. 单个反应的细胞数量是多少？

流式细胞仪检测推荐细胞总数为 $3-5 \times 10^6$ 。对于细胞爬片或者涂片，推荐60-90%汇合度。对于常规组织的冰冻切片或者石蜡切片，推荐切片厚度为2-5 μ m，避免切片太厚。

2. 是否需要避光？

荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。

3. 细胞离心条件？

对于悬浮细胞或者细胞悬液，洗涤时候离心条件推荐为300 g、5分钟。

4. 细胞固定条件？

细胞样品固定可以用1%甲醛的PBS溶液或者4%的中性多聚甲醛。组织切片样品推荐用4%的多聚甲醛。

5. 细胞通透处理条件选择？

细胞样品通透推荐用0.2%的Triton X-100或者70%的预冷乙醇-20 $^{\circ}$ C通透1-4小时。细胞样品可以在70%的乙醇溶液中-20 $^{\circ}$ C保存1周。冰冻切片样品通透可以选择0.5%的Triton X-100或者20 μ g/ml的蛋白酶K。石蜡切片样本推荐用20 μ g/ml的蛋白酶K进行通透处理。蛋白酶K做通透处理的时候，需要摸索通透时间，时间太短造成通透不彻底，时间太长容易脱片。。

6. 使用时需及时清洗流式细胞仪。

PI流式上机时具有一定的粘性，请及时清洗流式细胞仪，避免堵塞。连续上机数量过多也可能导致仪器堵塞导致数据误差，可在检测到一定数量的样本时进行次氯酸清洗，然后进行剩余样本的检测。

