

## 产品简介

细胞凋亡是高度有序的细胞死亡过程，对生物的正常发育和内稳态至关重要。细胞凋亡的特征之一是断裂基因组 DNA 片段暴露出的 3'-羟基 (3'-OH)。本试剂盒采用 TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) 方法，经 TdT 酶催化作用，在 DNA 的 3'-OH 末端催化掺入 fluorescein-dUTP，使用荧光显微镜直接观察即可快速检测细胞凋亡状况。本试剂盒适用于体外培养细胞和组织切片（冰冻切片或石蜡切片）细胞的凋亡检测。

## 试剂盒内容

组分	试剂内容	浓度	C11012-1 ( 20T )	C11012-2 ( 100T )
试剂 A	Fluorescein-dUTP Mix	50 $\mu$ M	50 $\mu$ L	250 $\mu$ L
试剂 B	TdT 酶	20U/ $\mu$ L	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L
试剂 C	5X TdT 酶缓冲液	5X	400 $\mu$ L	1mL X 2
试剂 D	100X DAPI 荧光染料	100X	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L

注：1) 按照说明书进行实验足够完成 20 孔 (96 孔板) 的 TUNEL 实验；

2) 试剂 C 有一定毒性，注意佩戴手套口罩避免皮肤接触。

## 运输与保存

**低温运输，-20°C 储存**，荧光试剂请**避光**保存，按照建议条件保存可稳定储存一年。

使用前需瞬时离心，以免损失。

## 细胞实验方法

### 实验准备

- 1X PBS ( pH 7.2~7.6 )
- 4% 多聚甲醛 ( PBS 配制 )
- 渗透剂 ( 含 0.5% Triton X-100 的 PBS )
- 十字孢碱、长春碱或 DNase I ( 用于阳性对照制作 )
- 2X SSC ( pH 7.0 )

## 操作步骤

### 1. 细胞培养

#### a. 贴壁细胞：

取对数生长期细胞，以每孔  $4 \times 10^3$ ~ $2 \times 10^4$  细胞接种于 96 孔板中，培养至正常生长阶段。细胞数量根据不同细胞系及细胞生长情况而定，实验前细胞密度达到 70%~80% 为宜。接种细胞时多接种几孔用于阳性对照及阴性对照样品制备。

#### b. 悬浮细胞：

每孔  $1 \times 10^5$ ~ $3 \times 10^6$  细胞接种于 6 孔板中，培养至正常生长阶段。

### 2. 药物处理

(可选) 客户可以根据实验需要进行各种药物处理。

### 3. 阳性对照制作

#### 3.a 贴壁细胞:(贴壁细胞 HeLa 为例, 96 孔板培养)

##### x. 使用十字孢碱(在细胞固定化之前)

细胞凋亡模型可以使用十字孢碱(Staurosporine, STS)处理 24 小时(终浓度 0.25-2 $\mu$ M)，根据不同细胞系需要优化具体处理浓度和处理时间，一般细胞轻微皱缩即可，处理时间不宜过长，防止细胞脱落。

3.a.x.1 弃去原有细胞培养基，用 1X PBS 小心清洗细胞(如果细胞贴壁能力较弱，可直接进行加药处理)；

3.a.x.2 加入含十字孢碱的新鲜培养基(终浓度 0.25~2 $\mu$ M)，置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 小时。

##### y. 使用 DNase I(在细胞固定化和通透之后)

3.a.y.1 制备 DNase I 酶混合处理液，每孔取 DNase I 酶 1 $\mu$ L (5U/ $\mu$ L)，DNase I 酶缓冲液 5 $\mu$ L，加入 44 $\mu$ L 去离子水中，混合均匀；

3.a.y.2 每孔加入 50 $\mu$ L DNase I 酶混合处理液，室温孵育 0.5~3 小时；

3.a.y.3 弃去 DNase I 酶混合处理液，每孔加入 100 $\mu$ L 1X PBS 清洗 2 次，每次 5 分钟。

#### 3.b 悬浮细胞:(悬浮细胞以 NCI-H929 为例, 6 孔板培养)

##### z. 使用长春碱(在细胞固定化之前)

细胞凋亡模型可以使用长春碱(Vinblastine)处理 24 小时(终浓度 20nM~100 $\mu$ M)，根据不同细胞系需要优化具体处理浓度和处理时间，一般细胞轻微皱缩即可，处理时间不宜过长。也可参考贴壁细胞制作阳性对照，但是在操作过程中需注意轻拿轻放，切勿晃动。

3.b.z.1 取细胞状态良好的细胞，计数，每孔接入  $1.5 \times 10^6$  个细胞；

3.b.z.2 加入含 100 $\mu$ M 长春碱培养基，轻轻摇匀，置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 小时。

### 4. 细胞固定化和通透

#### 4.a 贴壁细胞：

4.a.1 弃去细胞培养基，用 1X PBS 小心清洗并弃去(如果细胞贴壁能力较弱，可直接进行固定步骤)；

4.a.2 每孔加入 100 $\mu$ L 细胞固定液(含 4%多聚甲醛的 PBS)室温孵育 15 分钟，弃固定液；

4.a.3 每孔加入 100 $\mu$ L 1X PBS，孵育 5 分钟后，弃去 1X PBS；

4.a.4 (加强通透)每孔加入 100 $\mu$ L 渗透剂(含 0.5% Triton X-100 的 PBS)，室温孵育 10 分钟，弃去渗透剂并使用 1X PBS 清洗两次，每次 5 分钟。

#### 4.b 悬浮细胞：

4.b.1 将细胞收集至流式管中，用 1mL 1X PBS 重悬细胞，在室温以 1000×g 离心 10 分钟，用枪头吸弃上清，注意避免吸掉细胞，重复洗一次；

4.b.2 加入 500μL 细胞固定液（含 4%多聚甲醛的 PBS），4°C 固定 20 分钟；

4.b.3 1000×g 离心 10 分钟，用枪头吸弃上清，并重悬于 1mL 1X PBS 中，重复洗一次；

4.b.4（加强通透）每管加入 500μL 渗透剂（含 0.5% Triton X-100 的 PBS），室温孵育 5 分钟；

4.b.5 1000×g 离心 10 分钟，用枪头吸弃上清，并用 1mL 1X PBS 重悬细胞，重复洗一次。

### 5. TdT 酶连反应

#### 5.a 贴壁细胞：

5.a.1 5X TdT 酶缓冲液（试剂 C）在使用前请用去离子水稀释至 1X TdT 酶缓冲液；

5.a.2 每孔用 50μL 1X TdT 酶缓冲液覆盖细胞，室温下放置 5~10 分钟；

5.a.3 在平衡细胞的同时，在冰上解冻 Fluorescein-dUTP Mixture（试剂 A），并且依照下表准备足量的 TdT 酶缓冲液。采用 1X TdT 酶缓冲液代替 TdT 酶作为阴性对照组；

表 1 50μL 的 TdT 酶孵育液配制参考

顺序	缓冲液成分	各组份体积
1	1XTdT酶缓冲液（试剂C）	46.5μL
2	TdT酶（试剂B）	1μL
3	Fluorescein-dUTP Mixture（试剂A）	2.5μL

注：将试剂 A 和 TdT 酶孵育缓冲液需放置于冰上，避光。

5.a.4 弃去 1X TdT 酶缓冲液，每孔加入 50μL TdT 酶孵育液，37°C 避光孵育 2 小时，弃 TdT 酶孵育液；

5.a.5 每孔加入 100μL 2X SSC，室温放置 15 分钟以终止反应，弃 SSC；

5.a.6 加入适量 1X PBS，放置在脱色摇床或轻轻晃动样品清洗 2 次，每次 5 分钟。

#### 5.b 悬浮细胞：

5.b.1~5.b.3 同 5.a.1~5.a.3 一致；

5.b.4 弃去 1X TdT 酶缓冲液，每管加入 50μL TdT 酶孵育液，37°C 避光孵育 2 小时，每 15 分钟时间混匀细胞一次；

5.b.5 1000×g 离心 10 分钟，弃去 TdT 酶孵育液，1mL 1X PBS 重悬细胞，1000×g 离心 10 分钟，用枪头吸弃上清，重复一次；

5.b.6 流式细胞仪上机检测（建议染色完成后立即进行流式检测）。

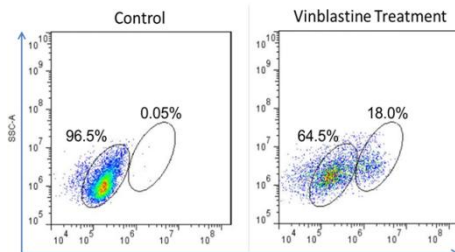


图 1 100μM 长春碱处理 NCI-H929 细胞 24h 后，采用 BD Accuri™ C6 流式细胞仪检测。

## 6. DNA 染色

### 6.a 贴壁细胞：

- 6.a.1 用去离子水稀释 100X DAPI 荧光染料, 制备适量 1X DAPI 反应液, 避光保存；
- 6.a.2 每孔加入 100 $\mu$ L 1X DAPI 反应液, 室温、脱色摇床避光孵育 30 分钟后, 弃染色反应液；
- 6.a.3 每孔加入 100 $\mu$ L 1X PBS 清洗 1~3 次, 每次 5 分钟；
- 6.a.4 客户可选择进行其他染色步骤, 否则每孔加入 100 $\mu$ L 1X PBS 保存待用。

## 7. 其他染色 (自备)

(可选) 客户可以根据实验需要进行细胞表面或细胞内抗原的抗体染色。

## 8. 图像获取及分析

建议染色完成后立即置于荧光显微镜进行观测, 最大激发波长为 495nm, 最大发射波长为 520nm (绿色荧光); 如果条件限制, 请避光 4 $^{\circ}$ C 湿润保存待测, 但不应超过 3 天。

# 组织切片实验方法 (以 1cm x 1cm 切片为例)

## 实验准备

- 1X PBS (pH 7.2~7.6)
- 4% 多聚甲醛 (PBS 配制)
- 渗透剂 (含 0.5% Triton X-100 的 PBS)
- DNase I (用于阳性对照制作)
- 蛋白酶 K 溶液 (20 $\mu$ g/ml, PBS 配制)

石蜡切片另备：

- 二甲苯
- 0.85% NaCl
- 梯度乙醇 (100%, 95%, 85%, 75%)

## 操作步骤

注：1) 使用前请瞬时离心；2) 以下各步操作建议在湿盒中进行；3) 请使用一次性手套，废液需妥善处理。

### 1. 切片处理

- 1.1 切片前处理：组织器官最好进行清洗，以去除组织或器官中的血液残留，降低背景；
- 1.2 切片厚度：3~10 $\mu$ m 为宜，切片过厚可能影响切片背景；
- 1.3 切片后处理：
  - 1) 石蜡切片：二甲苯洗脱 2 次 (5 分钟/次)；100%乙醇洗涤一次，室温 5 分钟；乙醇梯度 (100%，95%，85%，75%) 洗脱各 1 次 (3 分钟/次)，0.85% NaCl 和 PBS 各洗脱 1 次 (5 分钟/次)；
  - 2) 冰冻切片：室温放置 30 分钟；
- 1.4 固定：4%多聚甲醛固定 15 分钟，PBS 清洗 2 次，每次 5 分钟；
- 1.5 通透：加入 100 $\mu$ L 20  $\mu$ g/mL 蛋白酶 K 溶液，室温孵育 8~15 分钟 (厚度超过 4~6 $\mu$ m 的组织切片需要更长时间的孵育)，PBS 清洗 5 分钟；
- 1.6 洗涤后固定：4%多聚甲醛固定 5 分钟，PBS 清洗 5 分钟。

### 2. 阳性对照制作

使用 DNase I (在固定化和通透之后)

- 2.1 加 100 $\mu$ L DNase I 酶缓冲液，室温孵育 5 分钟；
- 2.2 制备 DNase I 酶混合处理液，DNase I 酶 2 $\mu$ L (5U/ $\mu$ L)，DNase I 酶缓冲液 10 $\mu$ L，加入 88 $\mu$ L 去离子水中，混合均匀；
- 2.3 弃去 DNase I 酶缓冲液，加入 100 $\mu$ L DNase I 酶混合处理液，室温孵育 30 分钟；
- 2.4 弃去 DNase I 酶混合处理液，1X PBS 清洗 3~4 次，每次 3 分钟。

### 3. TdT 酶连反应

- 3.1 5X TdT 酶缓冲液 (试剂 C) 在使用前请用去离子水稀释至 1X TdT 酶缓冲液；
- 3.2 每个面积小于 5cm<sup>2</sup> 的样品用 50 $\mu$ L 1X TdT 酶缓冲液覆盖，室温下放置 5~10 分钟；
- 3.3 在平衡的同时，在水上解冻 Fluorescein-dUTP Mixture (试剂 A)，且依照下表准备足量的 TdT 孵育缓冲液。采用 1X TdT 酶缓冲液代替 TdT 酶作为阴性对照；

表2 50μL的TdT酶孵育液配制参考

顺序	缓冲液成分	各组分体积
1	1X TdT酶缓冲液 (试剂C)	46.5 μL
2	TdT酶 (试剂B)	1 μL
3	Fluorescein-dUTP Mixture (试剂A)	2.5 μL

注：将试剂A和TdT酶孵育缓冲液需放置于冰上，避光。

- 3.4 弃去 1X TdT 酶缓冲液，每个样本加 50μL TdT 酶孵育液，37°C 避光孵育 2 小时，弃 TdT 酶孵育液；
- 3.5 加 100μL 2X SSC，室温放置 15 分钟以终止反应，弃 SSC；
- 3.6 加入适量 PBS，清洗 2 次，每次 5 分钟。

#### 4. DNA 染色

- 4.1 用去离子水稀释 100X DAPI 荧光染料，制备适量 1X DAPI 反应液，避光保存；
- 4.2 加入 100μL 1X DAPI 反应液，避光、室温、脱色摇床孵育 30 分钟后，弃染色反应液；
- 4.3 加入 100μL PBS 清洗 1-3 次，每次 5 分钟；
- 4.4 客户可选择进行其他染色步骤。

#### 5. 图像获取及分析

建议染色完成后立即进行观测，最大激发波长为 495nm，最大发射波长为 520nm（绿色荧光）；如果条件限制，请避光 4°C 湿润保存待测，但不应超过 3 天。

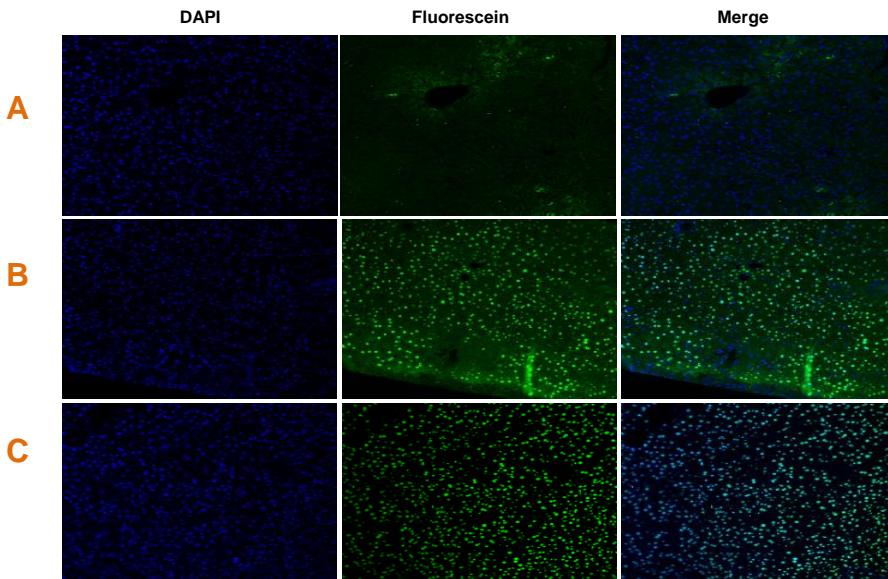


图 2 A 正常组：小鼠正常肝脏组织（TUNEL 阴性）；B 小鼠缺血再灌注损伤组：损伤模型（TUNEL 阳性）；C DNA 酶 I 阳性组：小鼠正常肝脏组织用 DNA 酶 I 处理（TUNEL 强阳性），采用 GE IN Cell Analyser 6500HS 高内涵筛选平台检测。