

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(显色法)

产品编号	产品名称	包装
C1098	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	50次

产品简介:

- 碧云天生产的显色法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(Colorimetric TUNEL Apoptosis Assay Kit)为您提供了一种高灵敏度又快速简便的细胞凋亡检测方法。对于待检测的细胞或组织样品,经过生物素标记和后续的DAB显色等步骤,即可在普通光学显微镜下观察到凋亡细胞。
- 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 ladder。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)的催化下加上生物素(Biotin)标记的dUTP(Biotin-dUTP),随后和辣根过氧化物酶(HRP)标记的Streptavidin (Streptavidin-HRP)结合,最后在HRP的催化下通过DAB显色来显示凋亡细胞,从而可以通过普通光学显微镜检测到凋亡的细胞,这就是本试剂盒通过TUNEL(**T**dT-mediated **d**UTP **N**ick-**E**nd **L**abeling)法检测细胞凋亡的原理。
- 本试剂盒有如下优点。(1) 高灵敏度:可以在单细胞水平检测到细胞凋亡,同时由于凋亡早期就有DNA断裂,可以检测到早期的细胞凋亡。(2) 特异性好: TUNEL检测时通常更容易标记凋亡细胞,而不容易标记坏死细胞。(3) 快速: 仅需约2-3个小时即可完成。(4) 应用范围广: 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。
- TUNEL法特异性检测细胞凋亡时产生的DNA断裂,但不会检测出射线等诱导的DNA断裂(和细胞凋亡时的断裂方式不同)。这样一方面可以把凋亡和坏死区分开,另一方面也不会把射线等诱导发生DNA断裂的非凋亡细胞判断为凋亡细胞。
- 极少数细胞凋亡时没有DNA断裂,此时不适用TUNEL法检测。在个别类型的坏死细胞中也发现TUNEL检测呈阳性。在需要严格判断细胞凋亡的情况下,最好同时检测多个凋亡指标。
- 本试剂盒足够检测50个样品。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C1098-1	TdT酶	100μl
C1098-2	Biotin-dUTP	1.2ml/管, 共2管
C1098-3	TdT酶稀释液(选用)	1ml
C1098-4	Streptavidin-HRP	55μl
C1098-5	Streptavidin-HRP稀释液	1.25ml/管, 共2管
C1098-6	DAB显色液A	15ml
C1098-7	DAB显色液B	15ml
C1098-8	标记反应终止液	15ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20℃保存。DAB显色液A和DAB显色液B需避光保存。

注意事项:

- 需自备用于洗涤细胞的PBS或HBSS,用于封片的抗荧光淬灭封片液(P0126)等适当的封片液,用于固定的4%多聚甲醛或向碧云天订购免疫染色固定液(P0098),同时需自备含0.1% Triton X-100的PBS或向碧云天订购免疫染色洗涤液(P0106)。需自备过氧化氢,除石蜡切片外需自备甲醇。
- 如果用于石蜡切片的检测,需自备蛋白酶K和二甲苯。蛋白酶K(ST533)可以向碧云天订购。
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 对于贴壁细胞或细胞涂片:
 - a. 用PBS或HBSS洗涤1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%多聚甲醛或碧云天生产的免疫染色固定液(P0098)固定细胞30-60分钟。

- d. 用PBS或HBSS洗涤1次。
 - e. 加入含0.1% Triton X-100的PBS或碧云天生产的免疫染色洗涤液(P0106)，冰浴孵育2分钟。
 - f. 用PBS或HBSS洗涤1次。
 - g. 在用甲醇配制的0.3%过氧化氢溶液(0.3% H₂O₂ in Methanol)中室温孵育20分钟，以灭活切片内源的过氧化物酶。随后用PBS或HBSS洗涤3次。
 - h. 转步骤5。
2. 对于悬浮细胞或细胞悬液：
 - a. 收集细胞(不超过200万细胞)，用PBS或HBSS洗涤1次。
 - b. 涂片，使细胞粘附在载玻片上。可以干燥样品使细胞贴得更牢，或使用适当的粘附试剂。
 - c. 用4%多聚甲醛或碧云天生产的免疫染色固定液(P0098)固定细胞30-60分钟。
 - d. 用PBS或HBSS洗涤1次。
 - e. 用含0.1% Triton X-100的PBS或碧云天生产的免疫染色洗涤液(P0106)，冰浴孵育2分钟。
 - f. 用PBS或HBSS洗涤1次。
 - g. 在用甲醇配制的0.3%过氧化氢溶液(0.3% H₂O₂ in Methanol)中室温孵育20分钟，以灭活切片内源的过氧化物酶。随后用PBS或HBSS洗涤3次。
 - h. 转步骤5。
 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20μg/ml不含DNase的蛋白酶K，20-37℃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. 用PBS或HBSS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的标记反应。
 - d. 在用PBS配制的3%过氧化氢溶液(3% H₂O₂ in PBS)中室温孵育10分钟，以灭活切片内源的过氧化物酶。随后用PBS或HBSS洗涤3次。注：请勿在用PBS配制的3%过氧化氢溶液中孵育过长时间，否则会出现过氧化氢导致的DNA断裂，从而产生假阳性。
 - e. 转步骤5。
 4. 对于冷冻切片：
 - a. 用4%多聚甲醛或碧云天生产的免疫染色固定液(P0098)固定细胞30-60分钟。
 - b. 用PBS或HBSS洗涤2次，每次10分钟。
 - c. 加入含0.1% Triton X-100的PBS或碧云天生产的免疫染色洗涤液(P0106)，冰浴孵育2分钟。
 - d. 在用甲醇配制的0.3%过氧化氢溶液(0.3% H₂O₂ in Methanol)中室温孵育20分钟，以灭活切片内源的过氧化物酶。随后用PBS或HBSS洗涤3次。
 - e. 转步骤5。

5. 配制生物素标记液：

参考下表配制适量的生物素标记液，需充分混匀。注意：配制好的生物素标记液必须一次使用完毕，不宜冻存。

	1个样品	5个样品	10个样品
TdT酶	2μl	10μl	20μl
Biotin-dUTP	48μl	240μl	480μl
生物素标记液	50μl	250μl	500μl

6. 样品的生物素标记：

- a. 在样品上加50μl 生物素标记液，37℃孵育60分钟。注意：孵育时需注意在周围用浸足水的纸或药棉等保持湿润，以尽量减少生物素标记液的蒸发。
- b. 用PBS或HBSS洗涤1次，滴加0.1-0.3ml标记反应终止液，室温孵育10分钟。
- c. 用PBS或HBSS洗涤3次。

7. Streptavidin-HRP工作液和DAB显色液的配制：

a. Streptavidin-HRP工作液的配制：

参考下表配制适量的Streptavidin-HRP工作液，需充分混匀。注意：配制好的Streptavidin-HRP工作液必须一次使用完毕，不宜冻存。

	1个样品	5个样品	10个样品
Streptavidin-HRP	1μl	5μl	10μl
Streptavidin-HRP稀释液	49μl	245μl	490μl
Streptavidin-HRP工作液	50μl	250μl	500μl

b. DAB显色液的配制：

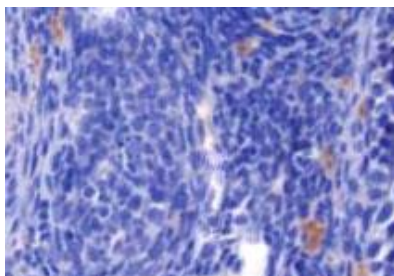
按照每个样品使用0.2-0.5ml显色液的比例配制适量DAB显色液。等体积混合适量DAB显色液A和DAB显色液B，充分混匀后即DAB显色液。注意：配制好的DAB显色液必须一次使用完毕，不宜冻存。

8. 样品的DAB显色：

- a. 在样品上加50μl Streptavidin-HRP工作液，室温孵育30分钟。注意：孵育时需注意在周围用浸足水的纸或药棉等保持

湿润，以尽量减少Streptavidin-HRP工作液的蒸发。

- b. 用PBS或HBSS洗涤3次。
- c. 滴加0.2-0.5ml DAB显色液，室温孵育5-30分钟或根据显色情况孵育适当时间。注：如果显色很强可以短于5分钟即停止显色，如果显色很弱，可以适当延长显色时间，甚至显色过夜。
- d. 用PBS或HBSS洗涤3次。
- e. 选做(本步骤可不作)：用苏木素染色液(C0107)或甲基绿染色液(C0115)进行细胞核染色。随后用PBS或HBSS洗涤3次。
- f. 直接进行观察，或用95%乙醇脱水5分钟，再用100%乙醇脱水2次，每次约3分钟，再用二甲苯透明2次，每次5分钟，随后封片观察。染色结果可参考下图：



小鼠卵巢切片TUNEL检测DAB显色结果
棕色为TUNEL染色阳性的凋亡细胞，蓝色为被苏木素染色的细胞核。

常见问题：

1. 出现非特异性显色。
 - 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显色。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染色。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. 染色背景很高。
 - 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。支原体染色检测试剂盒(C0296)可以向碧云天订购。
 - 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. 细胞内的过氧化物酶灭活不充分会导致很多细胞呈现阳性染色，改进过氧化物酶的灭活方法，例如延长灭活时间等会有所帮助。
 - e. 所使用的溶液有DNA酶污染。DNA酶污染导致的随即切割会导致产生一定的背景并干扰检测。把溶液高压灭菌可以有效灭活各种常见DNA酶。
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。

使用本产品的文献：

1. Zhang C, Wu R, Zhu H, Hu YZ, Jiang H, Lin NM, He QJ, Yang B.
Enhanced anti-tumor activity by the combination of TRAIL/Apo-2L and combretastatin A-4 against human colon cancer cells via induction of apoptosis in vitro and in vivo.
Cancer Lett. 2011 Mar 1;302(1):11-9.
2. Xu X, Gao X, Jin L, Bhadury PS, Yuan K, Hu D, Song B, Yang S.
Antiproliferation and cell apoptosis inducing bioactivities of constituents from *Diosma versipellis* PC3 and Bcap-37 cell lines.
Cell Div. 2011 Jun 15;6(1):14.
3. Liu M, Yang S, Jin L, Hu D, Wu Z, Yang S.
Chemical Constituents of the Ethyl Acetate Extract of *Belamcanda chinensis* (L.) DC Roots and Their Antitumor Activities.
Molecules. 2012 May 24;17(5):6156-69.
4. Peng YR, Ding YF, Wei YJ, Shu B, Li YB, Liu XD.
Caudatin-2,6-dideoxy-3-O-methyl-β-D-cymaropyranoside 1 induced apoptosis through caspase 3-dependent pathway in human hepatoma cell line SMMC7721.
Phytother Res. 2011 May;25(5):631-7.
5. Liu MC, Yang SJ, Jin LH, Hu DY, Xue W, Song BA, Yang S.
Synthesis and cytotoxicity of novel ursolic acid derivatives containing an acyl piperazine moiety.

- Eur J Med Chem. 2012 Dec;58:128-35. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.08.048. Epub 2012 Oct 6.
6. Liu L, Wang P, Liang C, He D, Yu Y, Liu X.
Distinct effects of Nampt inhibition on mild and severe models of lipopolysaccharide-induced myocardial impairment.
Int Immunopharmacol. 2013 Jul 2. pii: S1567-5769(13)00258-0. doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.017. [Epub ahead of print].
7. Zhu Z, Li K, Xu D, Liu Y, Tang H, Xie Q, Xie L, Liu J, Wang H, Gong Y, Hu Z, Zheng J.
Erratum to: ZFX regulates glioma cell proliferation and survival in vitro and in vivo.
J Neurooncol. 2013 Jul;113(3):533. doi: 10.1007/s11060-013-1174-7.