

M5 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒使用说明书

产品	单位	货号
M5 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒	10T	MF276-T
M5 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒	50T	MF276-01

【储存条件】 -20℃，避光保存。

【产品简介】

DNA fragmentation represents a characteristic of late stage apoptosis. DNA fragmentation in apoptotic cells can be detected by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL).

The TUNEL assay relies on the presence of nicks in the DNA which can be identified by TdT, an enzyme that catalyzes the addition of dUTPs that are secondarily labeled with a marker.

All the existing TUNEL assays contain the highly toxic sodium cacodylate which might induces apoptosis and also decrease DNA production and DNA strands. Our Cell Meter™ TUNEL Apoptosis Assay Kit uses proprietary buffer system free of sodium cacodylate.

The kit is based on incorporation of a fluorescence dye TF3 modified deoxyuridine 5'-triphosphates (TF3-dUTP) at the 3' OH ends of the DNA fragments that form during apoptosis. The assay is optimized for the direct detection of apoptosis in either detached or attached cells without using antibody.

The kit provides all the essential components with an optimized assay protocol. It is suitable for fluorescence microplate reader, fluorescence microscope, or flow cytometer. Its signal can be easily detected at Ex/Em = 550nm/590 nm.

【操作步骤】

This protocol only provides a guideline, and should be modified according to your specific needs.

Note: Thaw Components C at room temperature, keep Components A and B on ice before use.

1. Culture cells to an optimal density for apoptosis induction according to your specific protocol. We recommend about 30,000 to 50,000 cells/well for adherent cells grown in a 96-well microplate culture, or about 1 to 2×10^6 cells/mL for non-adherent cells. At the same time, culture a non-induced negative control cell population at the same density as the induced population for every labeling condition. Here are a few examples for inducing apoptosis in suspension culture:

- 1) Treat Jurkat cells with 2 μ g/ml camptothecin for 3 hours.
- 2) Treat Jurkat cells with 1 μ M staurosporine for 3 hours.
- 3) Treat HL-60 cells with 4 μ g/ml camptothecin for 4 hours.
- 4) Treat HL-60 cells with 1 μ M staurosporine for 4 hours.

2. Fixation and Permeabilization

2.1 Remove cell media.

2.2 Add 100 μ L/well/96-well plate of 4% formaldehyde fixative buffer (not supplied) to each well.

Note: For non-adherent cells, add desired amount (such as 2×10^6 cells/mL) of 4% formaldehyde fixative buffer.

2.3 Incubate plates for 20 to 30 minutes at room temperature.

2.4 Remove fixative.

Optional: add 100 μ L/well/96-well plate of the permeabilization reagent (0.2% Triton X-100 in PBS, not supplied) after the fixation if needed, and incubate the plate for 10 minutes at room temperature.

2.5 Wash the cells with PBS 2-3 times.

Optional: You may also prepare a positive control for TUNEL reaction using DNAase I by digesting cells with DNAase I for 30 min at room temperature before proceed to TUNEL reaction (Step 3)

3. TUNEL reaction

3.1 Prepare reaction mixture just before use based on the number of samples to be assayed:

Reaction Components	Volume Per Well
100X TF3-dUTP	0.5 uL
Reaction Buffer	50 uL
Total volume	50.5 uL

Note: Each cell line should be evaluated on an individual basis to determine the optimal cell density.

3.2 Add 50 uL of the reaction mixture (from Step 3.1) to each well or tube and incubate at 37°C for 60minutes.

3.3 Remove the reaction mixture, and wash the cells 3-5 times with 200 uL/well of PBS.

4. Monitor the fluorescence intensity by fluorescence microscope, flow cytometer, or fluorescence microplate reader at Ex/Em = 550/590 nm.

5. Optional: Stain the nucleus with 1X Hoechst (Component C, Ex/Em = 350/460 nm) for image analysis.

【数据分析】

1. 96-Well Fluorescence Plate Reader Sample Data:

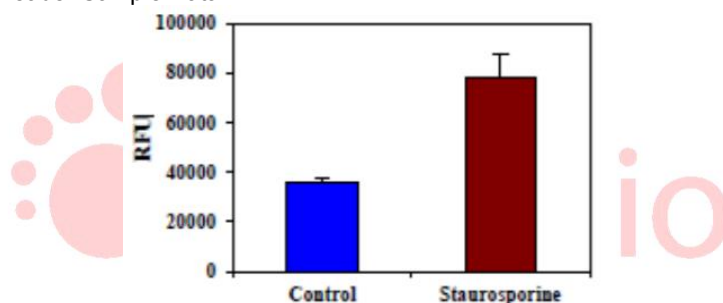


Figure 1. Apoptosis analysis in Hela cells using TUNEL Apoptosis Assay Kit. Hela cells at 30,000 cells/100μL/well were treated with 1 μM staurosporine for 4 h (Red) while un-induced cells were used as a control (Blue). Cells were incubated with reaction mixture for 1 hour at 37°C. The Fluorescence was measured at Ex/Em = 550/590 nm (cut off at 570 nm) with a Flex Station microplate reader using bottom read mode.

2. Fluorescence Microscope Sample Data:

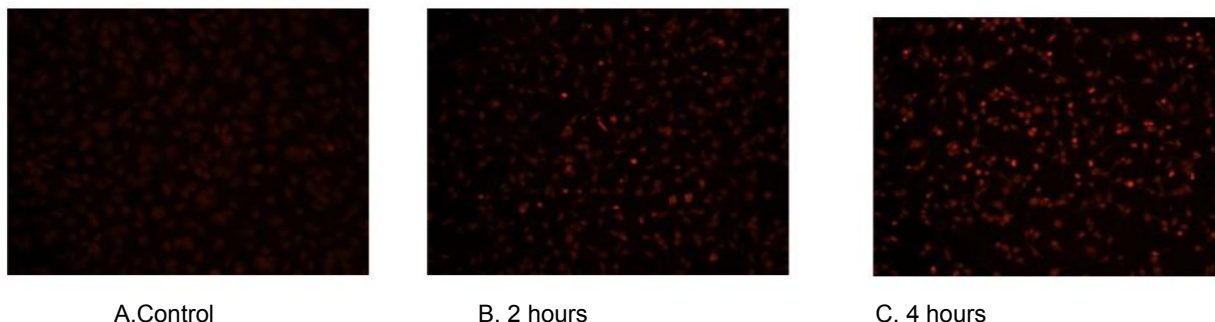


Figure 2. The Fluorescence imaging indicated the increase in TUNEL reaction with the addition of 1 μM staurosporin for 2h (B) or 4h (C) compare to control (A) in Hela cells. Cells were incubated with reaction mixture for 1 hour at 37°C. The Fluorescence intensity of the cells (30,000 cells/ 100 μL per well) was analyzed under a fluorescence microscope with a TRITC channel. DNA strand breaks are shown as more intense fluorescent staining spots in cells treated with staurosporin.

【产品简介】

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，造成细胞染色体 DNA 的降解。这种降解非常特异并有规律，所产生的不同长度的 DNA 片段约为 180 bp-200 bp 的整数倍，表现为琼脂糖凝胶电泳中呈现特异的梯状 Ladder 图谱。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)的催化下加上绿色荧光探针(SF488)标记的 dUTP(fluorescein-dUTP)，这就是 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法检测细胞凋亡的原理。488-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。TUNEL 法可以选择性的检测凋亡细胞，而非坏死细胞或因辐照和药物治疗而造成的 DNA 链断裂的细胞。TUNEL 实验中，TdT 酶催化 dUTP 掺入断裂的 DNA 链的 3'-OH 末端。抗原标记的 dUTP（如 digoxin-dUTP、生物素-dUTP），因为它可以直接进行原位检测，是一种更快速、直接的检测手段。

【产品组分】

产品组分编号	产品组份名称	包装	包装
Mf276-A	TUNEL Equilibration Buffer	2×1 mL	5 mL
Mf276-B	TUNEL Reaction Buffer	2×0.5 mL	5×0.5 mL
Mf276-C	TdT Enzyme	20 μ L	50 μ L
Mf276-D	Proteinase K (2 mg/mL)	40 μ L	100 μ L
Mf276-E	DNase I (2 U/ μ L)	5 μ L	13 μ L
Mf276-F	10 × DNase I Buffer	100 μ L	260 μ L

【注意事项】

- 1) 荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 2) TUNEL Equilibration Buffer 和 TUNEL Reaction Buffer 中含有 Sodium cacodylate trihydrate 和 Cobaltous chloride，使用时请佩戴口罩、手套，接触皮肤后，请立即有大量水冲洗，废液请按有毒物质处理。
- 3) 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 4) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

【自备材料】

PBS 缓冲液 (pH~7.4)；4%多聚甲醛 (in PBS)；牛血清白蛋白 (BSA) 或正常的羊、牛血清；70%乙醇 (自选)；脱蜡溶剂 (石蜡切片样本)

【使用方法】

一、样品的准备：

1、细胞样品的准备：

- 1) 可选：准备一份阴性对照样本（加入不含 TdT 酶的 TUNEL 反应液）。
- 2) PBS 清洗细胞两次。
- 3) 细胞固定：加入适量 4% 多聚甲醛(pH 7.4)溶液，4℃ 放置 30 min 。
- 4) PBS 清洗细胞两次。
- 5) 通透细胞：加入冰上预冷的 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。或者细胞可用配制于 PBS 中的 0.2% Triton X-100 溶液通透，室温放置 20 min 。

6) PBS 清洗细胞两次。

2、石蜡组织切片的准备:

- 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。注: 二甲苯有毒, 易挥发, 请在通风橱中进行此操作。
- 2) 室温下, 将切片样本浸没于无水乙醇中漂洗 2 次, 每次 5 min。
- 3) 室温下, 将切片样本连续浸没在不同浓度梯度的乙醇 (95%、90%、80%、70%) 中, 每种浓度各漂洗 1 次, 每次 5 min。
- 4) 室温下, 将切片浸没于纯水中漂洗 1 次, 每次 3 min, 再将切片浸没于 1×PBS 中漂洗 1 次, 每次 3 min, 用滤纸小心吸干切片样本周围多余液体。
- 5) 用免疫组化笔在切片样本周围描绘样品轮廓, 以便下游通透与标记。
- 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 20 min。(Proteinase K 的孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化)。

注: 蛋白酶 K 可以帮助渗透组织, 但延长孵育时间可能导致切片脱落, 所以要最优化孵育时间长短。时间一般为 10~30 min, 4 μm 左右的片子可以用 10 min, 但 30 μm 左右的可用 30 min。过长易脱片、过短起不到通透效果。

7) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min, 用滤纸吸去多余的液体, 将处理好的样品放在湿盒中保持湿润。注: 这一步必须把蛋白酶 K 洗涤干净, 否则会严重干扰后续标记反应。

3、冰冻组织切片样品的准备:

- 1) 将冰冻切片放置于室温的片架上, 室温 20 min, 晾干。
- 2) 将载玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液 (in PBS) 中, 室温固定 30 min。
- 3) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min。
- 4) 用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。
- 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 10 min。Proteinase K 的孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化)。

注: 蛋白酶 K 可以帮助渗透组织, 但延长孵育时间可能导致切片脱落, 所以要最优化孵育时间长短。时间一般为 10~30 min, 4 μm 左右的片子可以用 10 min, 但 30 μm 左右的可用 30 min, 需摸索最佳时间。过长易脱片、过短起不到通透效果。

6) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min, 用滤纸吸去多余的液体, 将处理好的样品放在湿盒中保持湿润。

4、阳性处理(仅阳性对照进行此步骤, 其他样品直接进行 TUNEL 反应步骤)

- 1) 按 1:10 的比例用 ddH₂O 将 10×DNase I Buffer 稀释成 1×DNase I Buffer 备用。
- 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, PBS 清洗样品 2 次

二、配制 TUNEL 检测液：

1、预先配制 TUNEL 反应混合液：每个样本需要已加入 1 uL TdT 酶的 50 uLTUNEL 反应缓冲液。

	待测样品数量	1	5	10
Mf276-C	TdT 酶溶液(uL)	1	5	10
Mf276-B	TUNEL Reaction Buffer (uL)	50	250	500

2、每个样本加入 100 μ L TUNEL 平衡缓冲液，孵育 5 min。

3、弃去平衡缓冲液，用滤纸小心吸去切片样本周围的多余液体，每个样本加入 50 μ L TUNEL 反应混合液。

a)贴壁细胞，用盖玻片使缓冲液均匀覆盖样本。37°C避光孵育 60 min。

b) 悬浮细胞，可加入微孔板中，采用微孔板振荡器进行孵育或每隔 15 min 温和的震荡反应管，使之充分反应。37°C避光孵育 60 min。

c)组织样本，用盖玻片使缓冲液均匀覆盖样本。将样本平放于湿盒内，37°C恒温箱孵育 2 小时，湿盒底部铺一张含少量水的纸巾保持湿度。37°C避光孵育 2 h。

4、去掉反应液，在 1×PBS 的染色缸中浸泡润洗 2 次，每次 5 min。再使用适量配制于 PBS 中的 0.1% Triton X-100，其中含 5 mg/mL BSA 的缓冲液清洗样本 3 次，每次 5 min，以降低背景。

5、(可选)复染：每个样本滴加浓度为 2 μ g/mL 的 DAPI 染液，避光室温孵育 10 min。染色完后，轻轻去掉染液，并将样本在 1×PBS 中浸泡润洗 3 次，每次 5 min。

6、(可选)封片：将切片样本先纯水浸没 5 min，再放入 70%乙醇浸没 5 min，再 80%乙醇浸没 5 min，90%乙醇浸没 5 min，95%乙醇浸没 5 min，无水乙醇浸没 5 min，最后将切片样本置于染色缸中以新鲜的二甲苯浸泡透明化处理 2 次，每次 5 min。(通风厨中操作)。脱水完成后，擦去切片周围的液体，每个切片样本滴加 50 μ L 抗荧光淬灭封片液，盖上盖玻片，用镊子的钝端轻轻敲击盖玻片，去除气泡以使封片完全。

7、用荧光显微镜或流式细胞仪观察、分析，F6013-B 是一种绿色荧光染料，激发波长、发射波长分别为 485 nm，515 nm(凋亡细胞应被标记上明亮的绿色荧光，没有加入 TdT 酶的阴性对照样本未被标记上荧光)。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。