

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(显色法)

Colorimetric TUNEL Apoptosis Assay Kit



产品详情

产品货号	产品名称	储存条件
SA1003	TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	-20℃

产品简介:

1. 萨默斯生产的显色法 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。
2. 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 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法检测细胞凋亡的原理。
3. 本试剂盒有如下优点。(1)高灵敏度:背景染色极低,阳性染色强,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。(5)实测效果好: 参考图 1。

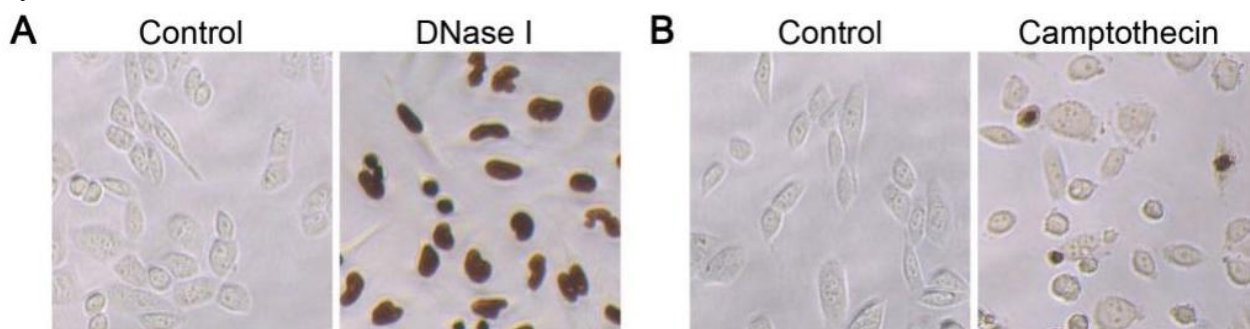


图 1. 本试剂盒的检测效果图。A. HeLa 细胞未处理或用 DNaseI 室温孵育 10 分钟后的检测效果图。B. HeLa 细胞未处理或用 10 μ M 喜树碱(Camptothecin)处理 24 小时后的检测效果图。图中棕褐色为 DAB 染色阳性细胞。本图中的染色实验均在 12 孔板中进行。本图仅作参考,不同的样品不同的检测条件,实际获得的结果可能和上图有较明显的差别。

4. 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。
5. 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。
6. 本试剂盒足够检测 20 个样品。

保存条件:

-20℃ 保存, DAB 显色液 A 和 DAB 显色液 B 需避光保存。

使用说明(仅供参考):

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%多聚甲醛或萨默斯生产的免疫染色固定液固定细胞 30 分钟。
- d. 用 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次。
- e. 加入萨默斯生产的免疫染色强力通透液或含 0.3%Triton X-100 的 PBS, 室温孵育 5 分钟。
- f. 用 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次。
- g. 在萨默斯生产的内源性过氧化物酶封闭液或 PBS 配制的 0.3%过氧化氢溶液(0.3% H_2O_2 in PBS) 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. 用萨默斯生产的免疫染色固定液或 4%多聚甲醛固定细胞 30 分钟。
- d. 用 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次。
- e. 加入萨默斯生产的免疫染色强力通透液或含 0.3% Triton X-100 的 PBS, 室温孵育 5 分钟。
- f. 用 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次。
- g. 在萨默斯生产的内源性过氧化物酶封闭液或 PBS 配制的 0.3%过氧化氢溶液(0.3% H_2O_2 in PBS) 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 20 μ g/ml 不含 DNase 的蛋白酶 K(推荐使用萨默斯的蛋白酶 K(20mg/ml), 用免疫染色洗涤液或 10mM Tris-HCl pH7.4-7.8 稀释 1000 倍即为 20 μ g/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. 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. 在萨默斯生产的内源性过氧化物酶强力封闭液或 PBS 配制的 3%过氧化氢溶液(3% H_2O_2 in PBS) 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。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. 用萨默斯生产的免疫染色固定液或 4%多聚甲醛固定细胞 30 分钟。
- b. PBS 或 HBSS 洗涤 2 次, 每次 10 分钟。
- c. 加入萨默斯生产的免疫染色强力通透液或含 0.3% Triton X-100 的 PBS, 室温孵育 5 分钟。
- d. 在萨默斯生产的内源性过氧化物酶封闭液或 PBS 配制的 0.3%过氧化氢溶液(0.3% H_2O_2 in PBS) 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	5 μ l	25 μ l	50 μ l
Biotin-dUTP	45 μ l	225 μ l	450 μ l
生物素标记液	50 μ l	250 μ l	500 μ l

6. 样品的生物素标记:

a. 在样品上加 50 μ l 生物素标记液, 37°C 避光孵育 60 分钟。注意: 50 μ l 生物素标记液适合涂片、切片或 96 孔板、48 孔板、24 孔板或 12 孔板的一个孔, 如果是 6 孔板中一个孔生物素标记液宜使用 100 μ l。如果待检测的样品为涂片、切片或在 24 孔板、12 孔板或 6 孔板中, 可以使用防蒸发膜, 或自行尝试使用自封袋或者其它适当材料自行裁剪成比孔略小的圆形塑料片, 滴加生物素标记液后覆盖在样品上, 可以防止生物素标记液蒸发, 并且使生物素标记液均匀覆盖样品。自行裁剪圆片时需要连着圆片突出一个角或连着一线, 并将圆形之外的突出部分折叠方便染色结束后利用突出部分顺利取出圆片。也可以用 PAPPen 圈出一个区域进行染色。孵育时需注意在多余的孔和多孔板的空隙中加入适量水以保持湿润, 从而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	1 μ l	5 μ l	10 μ l
Streptavidin-HRP 稀释液	49 μ l	245 μ l	490 μ l
Streptavidin-HRP 工作液	50 μ l	250 μ l	500 μ l

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, 充分混匀后即为 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. 样品的显色:

a. 在样品上加 50 μ l Streptavidin-HRP 工作液, 室温孵育 30 分钟。注意: 50 μ l Streptavidin-HRP 工作液适合涂片、切片或 96 孔板、48 孔板、24 孔板或 12 孔板的一个孔, 如果是 6 孔板中的一个孔 Streptavidin-HRP 工作液宜使用 100 μ l。如果待检测的样品为切片、涂片或在 24 孔板、12 孔板或 6 孔板中, 可以使用防蒸发膜, 或自行尝试使用自封袋或者其它适当材料自行裁剪成比孔略小的圆形塑料片, 滴加 Streptavidin-HRP 工作液后覆盖在样品上, 可以防止 Streptavidin-HRP 工作液蒸发, 并且使 Streptavidin-HRP 工作液均匀覆盖样品。自行裁剪圆片时需要连着圆片突出一个角或连着一线, 并将圆形之外的突出部分折叠, 方便染色结束后利用突出部分顺利取出圆片。也可以用 PAPPen 圈出一个区域进行染色。孵育时需注意在多余的孔和多孔板的空隙中加入适量水以保持湿润, 从而尽量减少 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. 染色效果可参见图 1 或图 2。

f. 选做(本步骤可以不做): 用苏木素染色液或甲基绿染色液进行细胞核染色。随后用 PBS 或 HBSS 洗涤 3 次。

g. 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。染色结果可参考图 2：

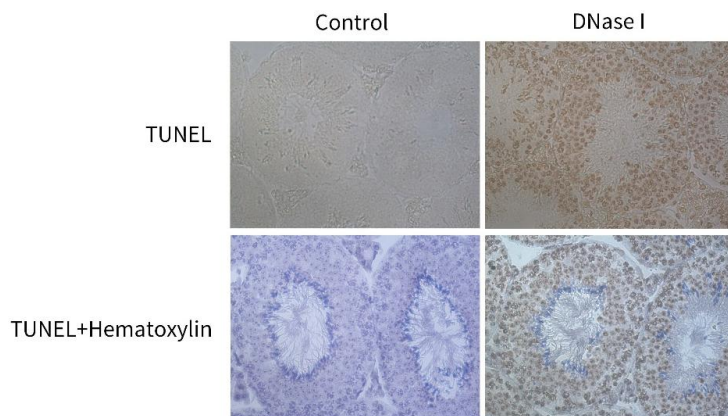


图 2. TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(显色法)用于小鼠睾丸切片的检测效果图。睾丸组织未处理(Control)或经 DNaseI 处理 60min 后(DNaseI)，用本试剂盒进行检测(TUNEL)，或本试剂盒检测后再用苏木素复染(TUNEL+Hematoxylin)。TUNEL 染色阳性的凋亡细胞显棕色，苏木素染色的细胞核显蓝色，被 TUNEL 染色呈现阳性的细胞通常不能再被苏木素染色。实际检测效果会因样品和检测条件的不同而存在差异，本图仅作参考。

常见问题：

1. 出现非特异性显色。

- 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。
- 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。
- 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。

- 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可以向萨默斯订购。
- 高速分裂和增殖的细胞，有时也会出现细胞核中的 DNA 断裂。
- 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。
- 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。
- 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。

- 使用乙醇或甲醇固定会导致标记的效率较低。
- 固定时间过长，导致交联程度过高。此时宜减少固定时间。
- 贴壁细胞如果使用药物诱导凋亡，会使发生凋亡细胞的贴壁性会减弱，所以建议在凋亡诱导结束后，用可以对多孔板进行离心的离心机 1000g 离心 5 分钟，然后再吸除培养基并用 PBS 洗涤。如果没有适合的离心机，请注意操作轻缓，防止发生凋亡的细胞在洗涤时洗去。后续整个操作也需要轻缓。

注意事项:

1. 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等适当的封片液, 用于固定的 4%多聚甲醛或向萨默斯订购免疫染色固定液, 同时需自备含 0.3% Triton X-100 的 PBS 或向萨默斯订购免疫染色强力通透液。需自备过氧化氢。
2. 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 可以向萨默斯订购。
3. DAB 对人体有害, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。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。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. 实验结果受多种因素影响, 相关处理仅限于产品本身, 不涉及其他赔偿。

免责声明: 本公司将不为任何不正常使用此产品时所发生的意外负责。

北京伊事达科技有限公司

电话: 13564444959

官网: www.followme-shop.com

地址: 北京市海淀区东北旺西路 58 号尚科办公社区 C 区一楼



公众号



客服