

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com

MESGEN
INNOVATION BIOTECHNOLOGY

产品原理

细胞发生凋亡时,会在生理生化及细胞形态上发生一系列变化。在凋亡中晚期,激活的 DNA 内切酶会切断核小体间的基因组 DNA, DNA 被降解成为约 180bp-200bp 的片段,而正常或者增殖细胞极少发生 DNA 断裂。利用这个差异,用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,然后进行荧光显微镜或者流式细胞仪检测,这个方法被称为 TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) 法细胞凋亡检测。

产品特点

1. 采用的重组 TdT 突变体酶活性更高,该转移酶的比活是其他试剂盒里 TdT 活力的 10 倍,同样情况下,不被标记的 3' -OH 末端可以顺利标记上荧光,因此检测灵敏度更高;
2. 试剂盒对标记反应进行了反复优化,采用最佳比例的 FITC-dUTP 和未标记的 dNTP 进行 3' -OH 末端的核苷酸掺入,从而提高检测灵敏度,同时减少非特异性反应;
3. 非凋亡细胞由于缺乏大量的 3' -OH 末端,不会被显著掺入和标记荧光素基团;
4. 产品使用方便,只需一步染色反应,染色完成后洗涤即可观察,约 1-2 个小时即可完成;
5. 应用范围广,既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或悬浮细胞的凋亡情况;

检测方法

荧光显微镜或流式细胞仪

样本类型

石蜡包埋组织切片、组织冰冻切片、细胞涂片一级细胞悬液

储存条件

-20°C 避光,避免反复冻融;

注意事项

1. 为了避免试剂损失,使用前可以低速短暂离心融化后的试剂,然后小心开管取用;
2. 试剂盒使用后尽快放回 -20°C 冰箱保存;
3. TdT 酶在 -20°C 保存时不会凝固,不需要提前取出融化,只需在使用前迅速从 -20°C 冰箱中拿出取用后立即放回 -20°C 保存。
4. FITC-12-dUTP 标记混合液对光敏感,避光储存于 -20°C,在标记时,孵育缓冲液或者包含标记混合物的载玻片要避免光照;

试剂盒组成

产品组成	10 tests	50 tests
5×平衡缓冲液	600ul	3ml
TdT酶	10ul	50ul
FITC标记混合液	50ul	250ul

操作方法

(1) 样本预处理

A. 石蜡包埋组织切片

1. 室温下将石蜡组织切片放入二甲苯中浸泡5分钟。更换新的二甲苯再浸泡5分钟以彻底脱掉石蜡。
2. 室温下用100%乙醇浸泡切片5分钟，更换新的100%乙醇再浸泡5分钟。
3. 室温下用梯度乙醇（90、80、70%）各浸洗1次，每次3分钟，逐渐增加水分。
4. 用PBS浸泡润洗切片，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体。这时可用石蜡笔或疏水笔在样品周围描绘样品分布的轮廓，便于下游通透性处理和平衡标记操作。在实验过程中，切勿让样品干燥。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。
5. 每个样本上滴加100 μ l浓度为20 μ g/ml的Proteinase K溶液（自备），使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育20分钟。
注意：Proteinase K帮助组织和细胞对后续步骤的染色试剂通透。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载玻片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到最好的结果，可能需要优化Proteinase K孵育的时间。
7. 用PBS溶液润洗样本2-3次。轻轻去掉多余液体，用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

B. 组织冰冻切片

操作流程与石蜡包埋组织切片相似，除了将脱蜡步骤替换为短暂的回温步骤，并将Proteinase K的处理时间缩短到10分钟。冰冻组织在进行实验之前应先固定。为避免在清洗步骤中样本脱片损失，建议不用洗瓶清洗，而是将玻片浸在PBS溶液中2-3次进行清洗。

注意：在操作中避免样本干燥！

1. 将玻片浸没在4%多聚甲醛溶液（溶于PBS）中，室温孵育30分钟。
2. 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。
3. 将玻片浸没在PBS溶液中，室温孵育15分钟。重复用PBS洗一次，共洗两次。
4. 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。这时可用石蜡笔或指甲油在样品周围描绘轮廓，便于下游通透性处理和平衡标记操作。在实验过程中，切勿让样品干燥。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。
5. 每个样本上滴加100 μ l浓度为20 μ g/ml的Proteinase K溶液（自备），使其覆盖全部样本区域，室温孵育10分钟。
注意：Proteinase K帮助组织和细胞对后续步骤的染色试剂通透。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载玻片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到最好的结果，可能需要优化Proteinase K孵育的时间。
7. 在盛有PBS溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本2-3次。
8. 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

C. 细胞样品

细胞爬片的准备：在Lab-Tek®载玻片小室(Chamber Slides)上培养贴壁细胞。在凋亡诱导处理之后，用PBS漂洗载玻片2次。进入后续实验。

细胞涂片的准备：多聚赖氨酸包被的载玻片的准备：吸取50–100 μ l 0.01% (W/V)多聚赖氨酸水溶液滴至每一片预清洗过的玻璃载玻片的表面。在将要用于固定细胞的区域将多聚赖氨酸溶液涂散为一薄层。待载玻片晾干之后，迅速用去离子水漂洗，然后让包被后的载玻片在空气中晾干30-60分钟。包被后的载玻片能在室温储存数月。以大概 2×10^7 个细胞/ml的浓度将细胞重悬在PBS中。吸50–100 μ l细胞悬液滴于多聚赖氨酸包被的载玻片上。用一片干净的载玻片轻柔地涂开细胞悬液，进入后续实验。

1. 固定细胞，将载玻片浸入装有4%多聚甲醛(新鲜配制于PBS)的染色缸中，在4°C放置25分钟。
2. 洗涤载玻片，将其浸入PBS中，室温放置5分钟。重复用PBS洗一次。
3. 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。可用石蜡笔或指甲油在样品周围描绘样品分布的轮廓，便于下游通透性处理和平衡标记操作。在实验过程中，切勿让样品干燥。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。
4. 每个样本上滴加100 μ l浓度为20 μ g/ml的Proteinase K溶液（自备），使溶液全部样本区域，室温孵育5分钟（也可浸于0.2%配制于PBS中的Triton® X-100溶液中，室温孵育5分钟进行通透处理）。
注意：Proteinase K帮助组织和细胞对后续步骤的染色试剂通透。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载玻片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到最好的结果，可能需要优化Proteinase K孵育的时间。
6. 在盛有PBS溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本2-3次。
7. 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

(2) 标记及检测

1. 按1:5的比例用去离子水稀释5 × 平衡缓冲液 (每个样本需用20 μl 5 × 平衡缓冲液和80 μl去离子水混合稀释成100 μl 1 × 平衡缓冲液)。
2. 滴加100 μl 1 × 平衡缓冲液使其全部覆盖待检样本区域, 室温孵育10-30分钟。或者将载玻片放入一个含有1 × 平衡缓冲液的缸中, 保证缓冲液没过样本。在平衡细胞的同时在冰上解冻FITC Labeling Mix, 并且依照表1, 准备足够量的用于所有实验的和可选阳性对照反应的TdT孵育缓冲液。对于面积小于5 cm²的一个标准反应, 所需体积是50 μl, 用50 μl乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需TdT孵育缓冲液的总体积。对于表面积更大的样本, 可成比例的增大试剂体积。

表1

组成	ul/50ul体系
5 × 平衡缓冲液	10
TdT酶	1
FITC标记混合液	5
超纯水	34

3. 在平衡后的区域周围用吸水纸吸掉100 μl 平衡缓冲液中的大部分, 然后在5 cm²面积的细胞上加上50 μl TdT孵育缓冲液。不要让细胞干掉。
4. 将封口膜剪成与组织或爬片同等大小, 轻盖在样本上以保证试剂的平均分布。在湿盒的底部放上用水浸湿的纸巾。将载玻片置于湿盒内, 37°C孵育60分钟。将湿盒用铝箔纸包裹以避免光照。
注意: 可折起封口膜的边缘以便于移除和操作。在第3步完成之后, 载玻片要避光。
5. 移除封口膜, 并将切片置于PBS溶液中室温孵育5分钟。
6. 轻轻去掉多余液体, 换用新鲜的PBS溶液室温孵育5分钟。重复该步骤1次。
7. 用滤纸轻轻擦掉样本周围及背面的PBS溶液。
注意: 为了降低背景, 载玻片在用PBS洗一遍之后, 可再用含0.1% Triton® X-100和5 mg/ml BSA的PBS洗三次, 每次5分钟, 这样可将游离的未反应标记物清除干净。
8. 样本在染色缸中染色, 在黑暗中将载玻片浸入装有PI溶液的染色缸, 室温放置5分钟, 此处PI溶液是用PBS新鲜配制并稀释到1 μg/ml的。可选操作: 样本在染色缸中染色, 在黑暗中将载玻片浸入装有DAPI溶液的染色缸, 室温放置5分钟, 此处DAPI溶液是用PBS新鲜配制并稀释到2 μg/ml的。
9. 洗涤样本, 将载玻片浸入去离子水中, 室温放置5分钟。重复两次, 总共洗三次。
10. 擦干载玻片上多余的水, 并向样本区域加100 μl PBS保持样本湿润。
11. 立即在荧光显微镜下分析样本, 用标准的荧光过滤装置在520 ± 20 nm的荧光下观察绿色荧光; 在>620 nm下观察PI的红色荧光, 或在460 nm观察蓝色的DAPI。如有必要, 载玻片能在4°C黑暗条件下存放过夜。
注意: PI/DAPI能将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色/蓝色。只在凋亡的细胞核中才有FITC掺入而产生的绿色荧光。

(3) 流式细胞术检测悬浮细胞的步骤

1. 将3-5 × 10⁶个细胞用PBS洗两次, 每次4°C 300 g离心10分钟。然后重悬在0.5 ml PBS中。
2. 固定细胞: 加入5 ml 1%配制于PBS中的多聚甲醛溶液, 冰上放置20分钟。
3. 细胞在4°C 300 g离心10分钟, 去上清并且重悬于5 ml PBS。重复洗一次并把细胞重悬在0.5 ml PBS中。
4. 通透细胞: 加入5 ml冰上预冷的70%乙醇, 在-20°C 孵育4小时。细胞能在70%乙醇中-20°C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5分钟。
5. 300 g离心10分钟, 弃上清, 细胞重悬于5 ml PBS。重复离心并把细胞重悬于1 ml PBS中。
6. 转移2 × 10⁶个细胞至一个1.5 ml的微量离心管。
7. 300 g离心10分钟, 去上清并把沉淀重悬在80 μl 1 × 平衡缓冲液 (按1:5的比例用去离子水稀释5 × 平衡缓冲液)中。室温孵育5

分钟。

8. 在平衡细胞的同时，冰上融解FITC标记混合物，并且依照表1准备足够量的用于所有反应的TdT孵育缓冲液。对于 2×10^6 个细胞的一个标准反应，所需体积是50 μ l。用50 μ l乘上反应数目来确定所需TdT孵育缓冲液的总体积。
9. 细胞在300 g离心10分钟，去上清并把沉淀重悬在50 μ l TdT孵育缓冲液中。37°C孵育60分钟，避免光照。每隔15分钟用微量移液器轻轻重悬细胞。
10. 加入1 ml 20 mM EDTA终止反应。用微量移液器轻柔混匀。
11. 300 g离心10分钟，去上清，细胞重悬于1 ml配制于PBS中的0.1% Triton® X-100，其中含5 mg/ml BSA。重复一次，总共洗两次。
12. 300 g离心10分钟，去上清，细胞重悬于0.5 ml 用PBS新鲜配制的5 μ g/ml PI溶液中，其中包含250 μ g无DNA酶的RNase A。
13. 在黑暗中室温孵育细胞30分钟。
14. 用流式细胞仪分析细胞。测量 520 ± 20 nm的FITC-12-dUTP的绿色荧光和 > 620 nm的PI 的红色荧光。

注意：PI将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色。只有凋亡的细胞核中有FITC掺入而产生的绿色荧光。

常见问题与解决方案

问题1. 高背景 (如，未凋亡细胞的强绿色荧光背景)

解决：非特异性掺入FITC。在操作过程中保持细胞湿润；标记反应完成，载玻片在用PBS洗一遍之后，可再用含0.1% Triton® X-100和5 mg/ml BSA的PBS洗三次，每次5分钟。

问题2. 荧光信号弱

解决：蛋白酶K或Triton® X-100的通透不充分。通过调整通透剂的孵育时间优化通透步骤。

问题3. 组织切片从载玻片上脱落

解决：组织切片粘附之前的包被不充分。在展片之前，用3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyl triethoxysilane, TESPA)包被显微镜载玻片比多聚赖氨酸 (poly-L-lysine)效果更好。

问题4. 最后显微镜或流式细胞仪分析只剩下很少的细胞

解决：在操作过程中丢失大量细胞：提高起始的细胞量；在制备贴到显微镜载玻片的细胞悬液时，离心过程中用含1%BSA的PBS洗细胞；在制备细胞悬液时，离心过程中用含1%BSA的PBS洗细胞。

仅供科学研究，不得用于临床治疗