

BeyoClick™ EdUTP-647 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1179S	BeyoClick™ EdUTP-647 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1179M	BeyoClick™ EdUTP-647 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天研发的BeyoClick™ EdUTP-647 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(BeyoClick™ EdUTP TUNEL Apoptosis Assay Kit with AF647), 是一种基于TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)方法在凋亡细胞DNA断裂处掺入胸腺嘧啶脱氧核苷三磷酸(Thymidine triphosphate)类似物EdUTP (5-ethynyl-dUTP), 随后通过点击反应(Click reaction)使EdUTP被AF647所标记, 从而实现简单、快速、高灵敏地检测细胞凋亡的试剂盒。基于点击反应的TUNEL检测, 检测灵敏度通常比常规的TUNEL法, 能提高约2倍或以上, 更容易检测到凋亡初期有较少DNA断裂的凋亡细胞。本试剂盒完成荧光染色的细胞或组织样品, 可以使用荧光显微镜、荧光酶标仪等荧光检测设备即可检测到呈现远红荧光的凋亡细胞。
- 经本试剂盒处理后, 凋亡的细胞在适当的荧光显微镜下呈现较强的远红荧光。通常该荧光探针被激发后, 肉眼不能观察到激发出来的长波长荧光, 但可以被很多成像系统例如激光共聚焦显微镜等或有相应激发和发射检测模块的荧光显微镜、流式细胞仪或荧光酶标仪检测所检测到, 也可以用于高内涵筛选(High-Content Screening, HCS)。流式细胞仪或荧光酶标仪检测仅适用于细胞样品, 不适用于组织切片。
- 细胞凋亡(Apoptosis)是生物体发育等生命过程中普遍存在的、由基因决定的细胞主动有序的死亡方式。当细胞遇到内、外环境因子刺激时, 启动基因调控的自杀保护措施, 去除体内非必需细胞或即将发生特化的细胞。在这一过程中, 细胞脱落离体或裂解为若干凋亡小体, 并迅速被巨噬细胞或邻近细胞清除, 这是一种由基因控制、高度有序的细胞自主死亡, 包含一系列信号事件组成的通路。细胞凋亡失调与多种疾病有关, 例如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)和癌症等。细胞凋亡通过特征性的形态学和生物化学变化而区别于坏死(Necrosis), 包括细胞皱缩、细胞核皱缩、核膜核仁破碎等等。
- 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)的催化下加上荧光或生物素标记的dUTP, 再通过荧光显微镜或显色法等进行检测[1], 这就是传统的TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法检测细胞凋亡的原理。由于dUTP通常包括荧光基团, 而荧光基团大小不一, 修饰后的dUTP的掺入率可能低于预期, 对TUNEL检测的灵敏度产生一定的影响; 另外TUNEL检测试剂盒中使用的荧光基团通常会出现光漂白和荧光光谱重叠问题, 从而降低多荧光通路检测能力。
- BeyoClick™ TUNEL系列产品使用的是炔基修饰的dUTP (5-Ethynyl-dUTP, EdUTP), 炔基中的碳碳三键(-C≡C-)是一种较小的生物正交官能团, 它修饰的dUTP比荧光或生物素标记的dUTP更容易通过TdT的催化掺入到断裂DNA上。掺入后, 一价铜离子催化荧光探针标记的叠氮化物(Labeled Azide)和炔基发生高特异性点击反应, 最终使凋亡细胞标记上相应的荧光[2]。本试剂盒的具体原理参见图1。

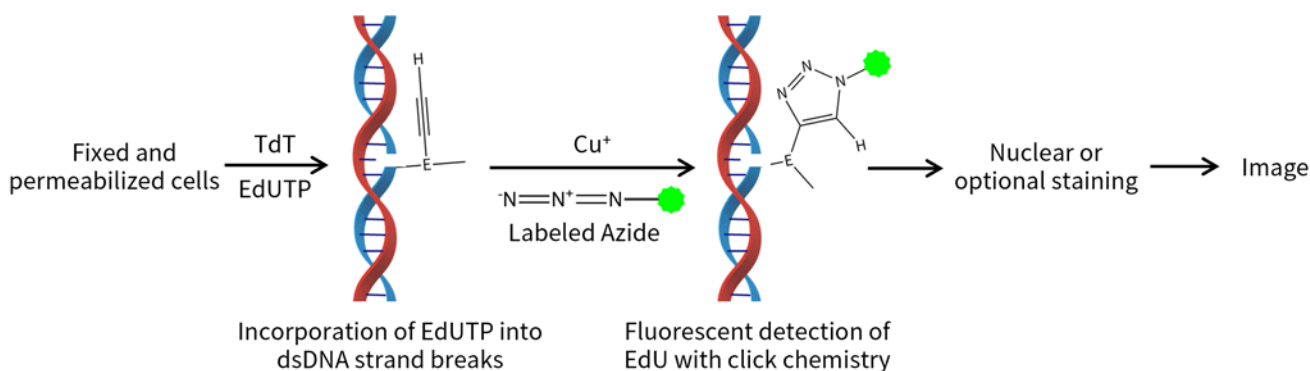


图1. 碧云天BeyoClick™ EdUTP-647 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(C1179)检测原理图。炔基修饰的dUTP (EdUTP)在TdT的催化下掺入到双链DNA的断裂处, 在一价铜离子的催化下, 与荧光探针标记的叠氮化物(Labeled Azide)发生点击反应(Click reaction), 最终使荧光探针标记在凋亡细胞的DNA断裂处。

- **本试剂盒的标记基团小, 渗透性更好, 灵敏性更高, 特异性更好。** EdUTP的分子量不超过500, 其掺入效率是荧光或生物素标记的dUTP的2倍以上, 且通过高特异性点击反应, 灵敏性和特异性更好。
- **本试剂盒操作简单, 检测效率高, 适用范围广。** 本试剂盒总体上操作比较简单便捷。与一步法TUNEL相比, 本试剂盒可在两小时或更短时间内的相同条件下检测出更高比例的凋亡细胞或染色效果更好, 可以用于荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光酶标

仪等荧光检测设备的检测，也可以用于高内涵筛选(High-content screening, HCS)。

- **本试剂盒可更高效准确检测早期凋亡细胞。**和常规的一部分TUNEL试剂盒相比，由于本试剂盒的EdUTP分子量更小，掺入效率更高，因此能有更高的检测灵敏度，对于凋亡早期较少DNA发生断裂的情况也能被更灵敏地检测到。
- **本试剂盒兼容细胞核染料。**本试剂盒对细胞核染料兼容性好。本试剂盒同时提供了Hoechst 33342 (1000X)，方便同时进行细胞核染色。使用本试剂盒检测正常HeLa细胞和经DNase I (D7073/D7076)和Staurosporine (PKC抑制剂) (S1882/S1883)处理的HeLa细胞的效果图参见图2。

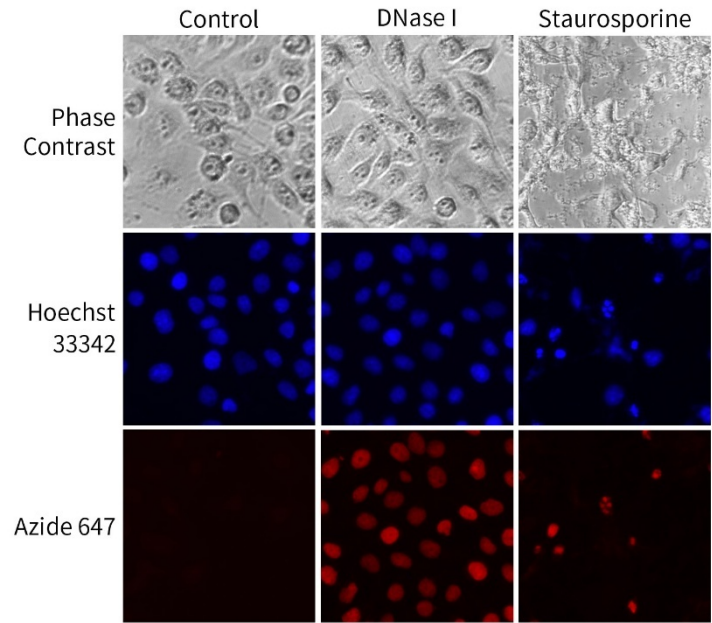


图2. 碧云天BeyoClick™ EdUTP-647 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(C1179)对HeLa细胞的检测效果图。本试剂盒检测正常HeLa细胞(最左侧一列)、经DNase I (D7073/D7076)处理的HeLa细胞(中间一列)和经0.25μM Staurosporine (PKC抑制剂) (S1882/S1883)处理18小时的HeLa细胞的效果图(最右侧一列)。图中的伪彩红色荧光为TUNEL染色阳性细胞，蓝色荧光为Hoechst 33342染色的细胞核。本图中的染色实验均在96孔板中进行。本图仅作参考，不同的样品不同的检测条件，实际获得的结果可能有较明显的差别。

- 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。
- 极少数类型的细胞凋亡不会发生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，需要同时检测多个细胞凋亡指标以进行验证。
- 按照使用说明操作，本试剂盒小包装和中包装可以分别进行20和100次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C1179S-1	TdT Reaction Buffer	5ml
C1179S-2	TdT	100μl
C1179S-3	EdUTP	25μl
C1179S-4	Azide 647	1.2ml
C1179S-5	CuSO ₄	50μl
C1179S-6	Click Additive	1管
C1179S-7	Hoechst 33342 (1000X)	25μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1179M-1	TdT Reaction Buffer	25ml
C1179M-2	TdT	500μl
C1179M-3	EdUTP	125μl
C1179M-4	Azide 647	6ml
C1179M-5	CuSO ₄	250μl
C1179M-6	Click Additive	1管
C1179M-7	Hoechst 33342 (1000X)	125μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。Azide 647和Hoechst 33342 (1000X)须避光保存。

注意事项：

- Click Additive配制成溶液后请注意适当分装冻存。如果溶解后有白色物质析出，请上下颠倒多次，待全部溶解后使用。如果该溶液颜色变成棕色，说明该组分的有效成分已失效，请弃用。
- 如果需要使用星形孢菌素(Staurosporine)作为对照，推荐使用碧云天Staurosporine (PKC抑制剂) (S1882/S1883)。
- 由于本产品需要铜离子催化进行点击反应，请注意如下的兼容性问题及解决方案。本产品完全兼容有机类染料如Alexa Fluor®系列普通染料及Fluorescein (FITC)、Allophycocyanin (APC)及APCE-tandems染料；对于Qdot®纳米晶体探针、Horseradish peroxidase (HRP)、R-phycoerythrin (R-PE)和R-PE-tandems染料如Alexa Fluor® 680-R-PE等，需要在点击反应完成后进行反应和检测；本产品会影响GFP、RFP、mCherry等荧光蛋白的荧光，对于荧光类蛋白如Green Fluorescent Protein (GFP)、TC-FlAsH™和TC-ReAsH™类试剂，需要在点击反应前进行反应和检测。由于Phalloidin (鬼笔环肽)不兼容点击反应，推荐使用Tubulin-Tracker Red (抗体法微管红色荧光探针) (C1050)进行细胞微管的检测。
- 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。
- 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. 需要自备的耗材和试剂。

- PBS，推荐使用PBS (C0221A)。
- 固定液，推荐使用免疫染色固定液(P0098)或4%多聚甲醛固定液(P0099)。
- 洗涤液，推荐使用免疫染色封闭液(P0102)、QuickBlock™免疫染色封闭液(P0260)或含3% BSA的PBS。
- 通透液，推荐使用免疫染色强力通透液(P0097)、免疫染色洗涤液(P0106)或含0.3% Triton X-100的PBS。
- 超纯水，推荐使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。
- DNase I，推荐使用TUNEL检测阳性对照制备试剂盒(C1082)、DNase I (D7073/D7076)。
- 根据实验要求准备：18×18mm盖玻片，96孔板或其它多孔板。
- 如果用于石蜡切片的检测，需自备Proteinase K (20mg/ml) (ST533)、无水乙醇、二甲苯或环保脱蜡剂(二甲苯替代品) (ST975)。

2. 对于贴壁细胞或细胞涂片。

- PBS或HBSS洗涤一次。
- 如果细胞贴得不牢，可以干燥样品使细胞贴得更牢。或者不洗涤直接固定。
- 用碧云天生产的免疫染色固定液(P0098)或4%多聚甲醛固定液(P0099)固定细胞30分钟。
- 用PBS或HBSS洗涤一次。
- 加入碧云天生产的免疫染色强力通透液(P0097)或含0.3% Triton X-100的PBS，室温孵育5分钟。
- 转步骤7。

3. 对于悬浮细胞或细胞悬液。

- 收集细胞(不超过200万细胞)，PBS或HBSS洗涤一次。
- 用碧云天生产的免疫染色固定液(P0098)或4%多聚甲醛固定液(P0099)固定细胞30分钟。为防止细胞聚集成团，宜在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动的同时进行固定。
- 用PBS或HBSS洗涤一次。
- 用碧云天生产的免疫染色强力通透液(P0097)或含0.3% Triton X-100的PBS重悬细胞，室温孵育5分钟。
- 转步骤7。

4. 对于石蜡切片。

- 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。也可以使用环保脱蜡剂(二甲苯替代品) (ST975)进行脱蜡。
- 滴加20μg/ml不含DNase的蛋白酶K (推荐使用碧云天的ST533 Proteinase K (20mg/ml)，用P0106 免疫染色洗涤液或10mM Tris-HCl pH7.4-7.8稀释1000倍即为20μg/ml不含DNase的蛋白酶K)，20-37°C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)。
- 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。
- 转步骤7。

5. 对于冰冻切片。

- 用碧云天生产的免疫染色固定液(P0098)或4%多聚甲醛液(P0099)固定细胞30-60分钟。
- PBS或HBSS洗涤2次，每次10分钟。
- 加入碧云天生产的免疫染色强力通透液(P0097)或含0.5% Triton X-100的PBS，室温孵育5分钟。
- 转步骤7。

6. (可选)阳性对照制备。

- 用双蒸水或MilliQ级纯水稀释适量Reaction Buffer至1X。
- 在100μl 1X Reaction Buffer中精确加入1μl DNase I，混匀，滴加到样品上。

c. 室温(25°C)孵育10-30分钟。如果室温稍低于25°C, 可以适当延长孵育时间; 反之如果室温稍高于25°C, 可以适当缩短孵育时间。

7. EdUTP标记。

- a. 本步骤及后续的 ‘EdUTP检测’ 步骤以96孔板一个孔或一个切片的检测为例进行说明。48孔板、24孔板的一个孔, 可以参考96孔板的用量, 12孔板或6孔板的一个孔液体用量可以适当加大。如果待检测的样品为涂片、切片或在24孔板、12孔板或6孔板中的样品, 可以使用多用途防蒸发膜(FAM906/FAM912/FAM924), 滴加相应液体后覆盖在样品上, 可以防止液体蒸发, 并且使液体均匀覆盖样品。也可以用免疫组化笔圈出一个区域进行染色。免疫组化笔推荐选购Liquid Blocker Super PAP Pen (免疫组化笔) (P0139)。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, 从而尽量减少液体的蒸发。用PBS或HBSS洗涤1次。
- b. 每样加入100μl TdT Reaction Buffer进行平衡, 以提高后续的标记效率。轻轻摇晃以确保TdT Reaction Buffer可以均匀覆盖样品。
- c. 室温孵育10分钟。
- d. 参考下表配制适量的EdUTP标记液, 需充分混匀。注: EdUTP标记液须现用现配, 不能冻存。

Components	Wells of 96-well plates					
	1	2	5	10	25	50
TdT Reaction Buffer	44μl	88μl	220μl	440μl	1.1ml	2.2ml
TdT	5μl	10μl	25μl	50μl	125μl	250μl
EdUTP	1μl	2μl	5μl	10μl	25μl	50μl
Total Volume	50μl	100μl	250μl	500μl	1.25ml	2.5ml

- e. 接步骤c, 小心吸除TdT Reaction Buffer, 然后每样滴加50μl EdUTP标记液, 轻轻摇晃以确保EdUTP标记液均匀覆盖样品。
注: 50μl EdUTP标记液适合 96孔板的一个孔或涂片和切片; 如果是48孔板或24孔板的一个孔, 50μl也基本够用; 12孔板或6孔板的一个孔, EdUTP标记液的用量宜适当增加, 以覆盖样品为宜。
- f. 37°C孵育60分钟。也可以根据实际效果适当调整孵育时间为30-60分钟。
- g. 吸除EdUTP标记液, 用洗涤液洗涤3次, 每次3-5分钟。

8. EdUTP检测。

- a. 配制Click Additive Solution: 对于小包装, 用0.13ml超纯水溶解试剂盒中提供的1管Click Additive, 混匀至全部溶解, 即为Click Additive Solution; 对于中包装, 加入0.65ml超纯水溶解试剂盒中提供的1管Click Additive, 混匀至全部溶解, 即为Click Additive Solution。配制后可以适当分装后在-20°C保存。
- b. 参考下表配制Click反应液。注: 请严格按照下表中组分顺序和体积配制Click反应液, 否则点击反应可能无法有效进行; Click反应液须在配制后15分钟内使用。

Components	Wells of 96 well plates					
	1	2	4	10	25	50
Azide 647	43μl	86μl	172μl	430μl	1.075ml	2.15ml
CuSO ₄	2μl	4μl	8μl	20μl	50μl	100μl
Click Additive Solution	5μl	10μl	20μl	50μl	125μl	250μl
Total Volume	50μl	100μl	200μl	500μl	1.25ml	2.5ml

- c. 去除上一步骤中的洗涤液。
- d. 每孔加入50μl Click反应液, 轻轻摇晃以确保Click反应液可以均匀覆盖样品。
- e. 室温避光孵育30分钟。
- f. 吸除Click反应液, 用洗涤液洗涤3次, 每次3-5分钟。
- g. 如果需要对细胞核进行染色, 可以参照步骤10进行。如无其它的特殊需要, 即可在荧光显微镜下观察, 或者使用荧光酶标仪进行荧光检测, 或者用高内涵筛选仪器(一般高内涵筛选需要使用染料对细胞核进行染色)进行检测。Azide 647的最大激发波长是650nm, 最大发射波长是670nm。使用多功能酶标仪时宜使用顶读功能以定量相应的荧光强度。

9. (可选)抗体染色。

参考一抗、二抗的说明书对相应的抗体进行稀释, 并孵育、洗涤一定时间。
具体操作可以参考如下网页: <http://www.beyotime.com/support/immunol-staining.htm>

10. 细胞核染色。

- 为了检测凋亡细胞的比例或方便观察每个细胞, 可以考虑使用Hoechst 33342进行细胞核染色。通常高内涵筛选仪器也需要对细胞核进行染色。
- a. 1X Hoechst 33342溶液的配制: 按1:1000比例用PBS稀释本试剂盒提供的Hoechst 33342 (1000X), 例如取1μl Hoechst 33342 (1000X)加入1ml PBS中, 混匀, 即得1ml 1X Hoechst 33342溶液。
- b. 接步骤8g, 吸除洗涤液后, 每孔加1X Hoechst 33342溶液100μl, 室温避光孵育10分钟。
- c. 吸除1X Hoechst 33342溶液。
- d. 用洗涤液洗涤3次, 每次3-5分钟。
- e. 随后即可进行荧光检测。Hoechst 33342为蓝色荧光, 最大激发波长为346nm, 最大发射波长为460nm。

常见问题：

1. 出现非特异性荧光标记。
- 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荧光标记。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荧光。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. 荧光背景很高。
- 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。不同方法的支原体检测试剂盒(C0296/C0297/C0298/C0301/C0303/C0305)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。
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。
- c. 荧光淬灭。荧光在普通光照10分钟就会严重淬灭。解决方法是需注意避光操作。
- d. 碘化丙啶双染时，如果碘化丙啶染色过深会导致观察到的本试剂盒的TUNEL染色效果减弱。碘化丙啶可以接受fluorescein激发产生的荧光，从而起到淬灭作用。解决方法是用较低浓度的碘化丙啶染色，例如0.5µg/ml碘化丙啶。
- e. 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1000×g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。

参考文献：

1. Loo DT. Methods Mol Biol. 2011. 682:3-13.

2. Wang W, Vinocur B, Altman A. Planta. 2003. 218(1):1-14.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0007	细胞凋亡-DNA Ladder抽提试剂盒	50次
C1086	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	20次
C1088	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	50次
C1089	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	20次
C1090	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	50次
C1091	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	20次
C1098	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	50次
C1062	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	20次/50次/100次
C1065	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	20次/50次/100次
C1067	Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒	20次/50次
C1082	TUNEL检测阳性对照制备试剂盒	10次
C1170	BeyoClick™ EdUTP-488 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒	20次/100次
C1173	BeyoClick™ EdUTP-555 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒	20次/100次
C1176	BeyoClick™ EdUTP-594 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒	20次/100次
C1179	BeyoClick™ EdUTP-647 TUNEL细胞凋亡检测试剂盒	20次/100次
C1182	BeyoClick™ EdUTP TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	20次/100次
C2035S	DNA损伤检测试剂盒(γ-H2AX免疫荧光法)	>100次
C2036S	DNA损伤检测试剂盒(γ-H2AX免疫荧光法, 兔单抗, 红色)	>100次
C2037S	DNA损伤检测试剂盒(γ-H2AX免疫荧光法, 鼠单抗, 绿色)	>100次
C2038S	DNA损伤检测试剂盒(γ-H2AX免疫荧光法, 鼠单抗, 红色)	>100次
C2041	彗星电泳试剂盒	20次/100次