

TUNEL assay Protocol

2024. 6 ver.1

by T. Baba

1. 24 well プレートに、火炎滅菌したカバーガラス (Micro cover glass, Matsunami #12 丸 No.1) を敷いたのち、Collagen Type I-C solution 500 μ L/well を添加し、室温にて一晩振盪する。

Collagen Type I-C solution (30 μ g/mL)

Cellmatrix Type I-C (3.0 mg/mL) 1 mL を滅菌水 100 mL に希釈する。

2. PBS で 3 回洗浄した後に、細胞を播種する。
3. 適宜、遺伝子導入、薬剤添加などの細胞の処理を行う。
4. アスピレーターにて培地を除去した後、速やかに 4.0% PFA/PBS (4°C 保存) 500 μ L/well を添加して細胞を固定する (RT 15 min) 。
5. PBS 500 μ L/well にて 2 回洗浄する。
6. 0.25% Triton X-100/PBS 500 μ L/well (RT 5 min shake x 1) にて処理する。

0.25% Triton X-100/PBS

2.5 mL の 20% Triton X-100 を 200 mL の PBS に添加する。

7. PBS 500 μ L/well (RT 5 min shake x 3) にて洗浄する。
8. 操作 7 の間に、TUNEL reaction mixture を作成する (氷上) 。

TUNEL reaction mixture (In Situ Cell Death Detection Kit TMR red, Roche, 12156792910)

- Enzyme Solution (TdT): 2.0 μ L (Working concentration: 1/10)
- Label Solution (TMR-dUTP): 18 μ L

Total: 20 μ L/well

*キットのプロトコールでの推奨は 500 μ L/well だが、20 μ L/well でも遜色なく標識可能

9. 操作 7 の完了後、チップ等を用いてカバーガラスをウェルの中心に移動させた後、TUNEL reaction mixture 20 μ L/well をカバーガラスの中央にゆっくりと滴下する。

10. アルミホイルにて遮光した状態で、インキュベーター内で 37℃にて 60 min 反応させる。
11. PBS 500 μ L/well (RT 5 min shake x 3) にて洗浄する。
12. 操作 11 の間に、核染色液を作成する。

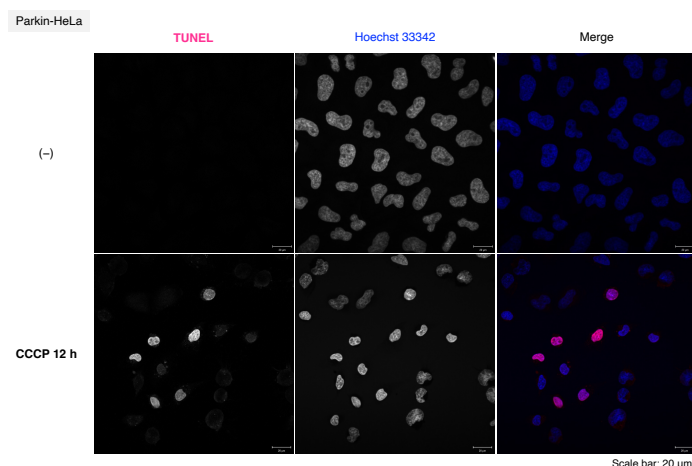
核染色液

- Hoechst33342 (bisBENZIMIDE, Sigma #B-2261) 10 mM stock: 0.4 μ L (20 μ M, 1/500)
- PBS: 199.6 μ L

Total: 200 μ L/well

13. アルミホイルにて遮光した状態で、核染色液 200 μ L/well (RT 20 min shake) にて染色する。
14. PBS 500 μ L/well にて 2 回洗浄する。
15. スライドガラス (Micro slide glass, Matsunami #S-0314 NEO 白縁磨 No.2) 上にマウント剤 Fluoromount/Plus (日本ターナー #DBS K048) を滴下する。
16. ピンセットでカバーガラスを取り出し、Milli-Q H₂O で軽くすすいだ後に、細胞が乗った面をマウント剤に接着させるようにして置く。
17. アルミホイルにて遮光した状態で、水平を保ちながら室温で乾燥させる。
18. マウント剤が完全に乾燥したことを確認した後に、蛍光顕微鏡で観察する。

TMRed (TUNEL) は 546 nm レーザー、Hoechst33342 は 405 nm レーザーにて励起



Parkin-HeLa 細胞にて、脱共役剤 CCCP 12 h 処理した後、TUNEL assay を実施 (by T. Baba)