

Elabscience® One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit

货号：GCQ0048/GCQ0049/GCQ0050/GCQ0051/GCQ0052

规格：20 Assays/50 Assays/100 Assays

产品组分

| 产品编号        | 产品名称                                | 20 Assays | 50 Assays | 100 Assays | Storage                  |
|-------------|-------------------------------------|-----------|-----------|------------|--------------------------|
| E-CK-A32A   | TdT Equilibration Buffer            | 4 mL      | 9 mL      | 9 mL×2     | -20℃                     |
| E-CK-A32B   | TdT Enzyme                          | 100 μL    | 250 μL    | 250 μL×2   | -20℃                     |
| E-CK-A32C   | Proteinase K (100×)                 | 20 μL     | 50 μL     | 100 μL     | -20℃                     |
| E-CK-A320D/ | Labeling Solution(FITC)/            |           |           |            |                          |
| E-CK-A321D/ | Labeling Solution(Elab Fluor® 488)/ |           |           |            |                          |
| E-CK-A322D/ | Labeling Solution(Elab Fluor® 594)/ | 100 μL×2  | 100 μL×5  | 100 μL×10  | -20℃                     |
| E-CK-A324D/ | Labeling Solution(Elab Fluor® 647)/ |           |           |            |                          |
| E-CK-A325D* | Labeling Solution(Elab Fluor® 555)  |           |           |            |                          |
| E-CK-A32E   | DNase I (20 U/μL)                   | 5 μL      | 13 μL     | 25 μL      | -20℃                     |
| E-CK-A32F   | DNase I Buffer (10×)                | 300 μL    | 700 μL    | 1500 μL    | -20℃                     |
| E-CK-A163   | DAPI Reagent(25 μg/mL)              | 100 μL    | 250 μL    | 500 μL     | 2-8℃/-20℃, shading light |
| 说明书         | 一份                                  |           |           |            |                          |

\*Labeling Solution 每个货号对应的荧光素不同。

产品简介

Elabscience® One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit 是一款灵敏度高且能快速简便的检测细胞凋亡的产品。本试剂盒适用于组织样本(石蜡切片、冰冻切片)和细胞样本(细胞涂片、细胞爬片)的原位凋亡检测，检测结果可通过荧光显微镜直接观察。

检测原理

细胞在发生凋亡时，会激活一些特异性的 DNA 内切酶，这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA。使得凋亡细胞的 DNA 被切割成 180~200bp 片段，在琼脂糖凝胶上通常以 180~200bp 的阶梯状迁移。TdT 酶（脱氧核糖核酸末端转移酶）将标记的 dUTP 连接到断裂 DNA 暴露的 3'-OH 末端，通过在这些末端添加荧光 dUTP 的方式来标记晚期凋亡细胞，从而可以通过荧光显微镜进行检测。

检测样本类型

☑细胞爬片/涂片    ☑石蜡切片    ☑冰冻切片

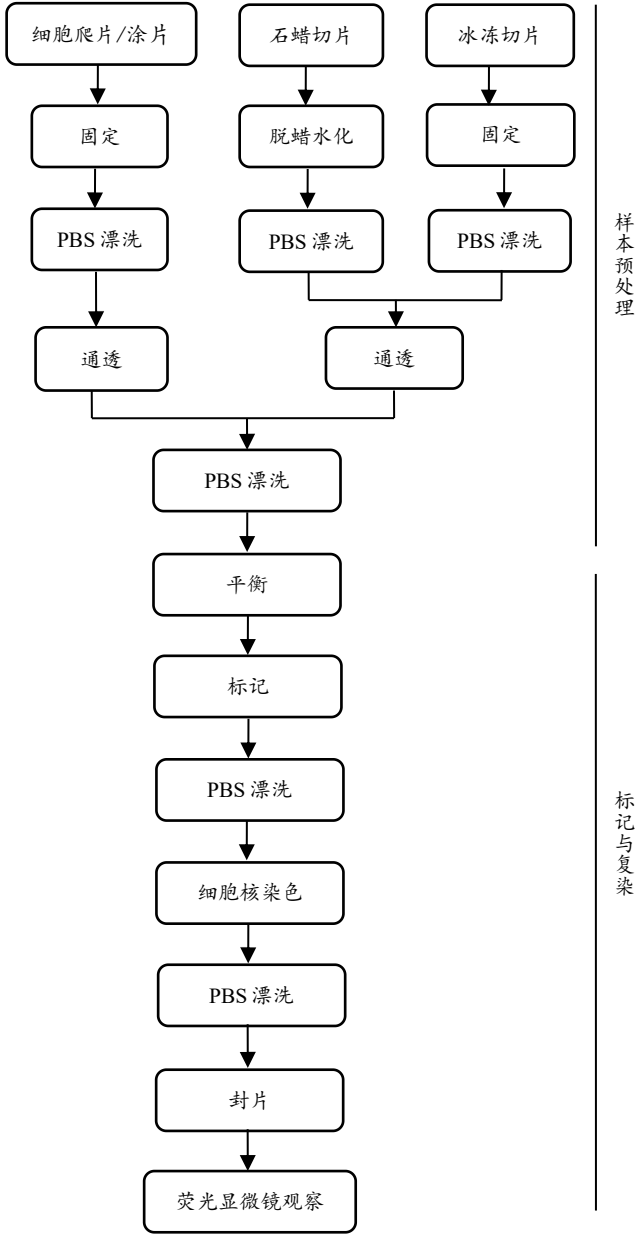
保存条件

-20℃ 可保存一年，Labeling Solution 和 DAPI Reagent (25 μg/mL) 需避光保存。

自备试剂及仪器

- 1) 细胞样本：  
固定液：多聚甲醛用 PBS 稀释至浓度为 4%。  
通透液：Triton X-100 用 PBS 稀释至浓度为 0.2%。该溶液可提前 1~2 天配制并放在 4℃ 保存。
- 2) 石蜡切片：  
二甲苯、无水乙醇。
- 3) 冰冻切片：  
固定液：多聚甲醛用 PBS 稀释至浓度为 4%。
- 4) 其他试剂：  
PBS、ddH<sub>2</sub>O、含抗荧光淬灭剂的封片液。
- 5) 仪器：  
荧光显微镜。

实验流程



试剂配制

- 1) **1×蛋白酶 K 工作液**：取 1 μL Proteinase K (100×) 加入 99 μL PBS 中，混匀。现用现配。
- 2) **1×DNase I Buffer 工作液**：按照 9:1 的比例用 ddH<sub>2</sub>O 将 DNase I Buffer (10×) 稀释待用。现配现用。
- 3) **DNase I 工作液 (200 U/mL)**：用 1×DNase I Buffer 工作液，按照 99:1 稀释比将 DNase I (20 U/μL) 稀释待用。现配现用。  
**注：DNase I 会在剧烈混合下变性，建议不要涡旋 DNase I 溶液。**
- 4) **DAPI 工作液**：取 4 μL DAPI Reagent(25 μg/mL) 加入 96 μL PBS 中混匀。现配现用。

固定与通透

1. 细胞样本

- 1) 细胞爬片：将细胞爬片浸入 PBS 漂洗 1 次，滤纸吸干周围水分，再浸入固定液（自备），室温固定 15~20 min 或 4℃ 固定 1~2 h。  
细胞涂片：收集细胞，加入一定体积的 PBS 重悬细胞沉淀，然后加入和 PBS 等体积的固定液（自备），室温固定 15~20 min 或 4℃ 固定 1~2 h。600×g 离心 5 min，PBS 重悬，取 25~50 μL 细胞悬液涂片在载玻片上晾干。  
**注：细胞固定是分析凋亡样本的重要步骤。未固定的细胞可能会丢失较小的 DNA 片段，导致较低的信号。**
- 2) 固定好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 3) 将样本浸入通透液（自备）中，37℃ 作用 10 min。
- 4) 将通透好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

2. 石蜡切片

- 1) 用常规方法将切片脱蜡水化。将切片浸入二甲苯（自备）脱蜡 2 次，每次 10 min；无水乙醇（自备）浸泡切片 2 次，每次 5 min；90%、80%、70% 的乙醇水溶液（自备）各一次，每次 3 min。

- 注：低温可能影响二甲苯脱蜡效果。当室温低于 20℃ 时，二甲苯脱蜡时间可延长至 20 min。**
  - 2) 脱蜡好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
  - 3) 滤纸吸干切片组织周围的水分，每个样本上滴加 100 μL 1×蛋白酶 K 工作液，37℃ 反应 20 min。  
**注：不同组织或物种的样本反应时间可能不同。建议进行预实验，确定反应时间。**
  - 4) 将通透好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
3. 冰冻切片
- 1) 取出冰冻切片，平衡至室温，再浸入固定液（自备），室温（15~25℃）固定 30 min。
  - 2) 固定好的样本浸入 PBS 漂洗 2 次，每次 5 min。
  - 3) 每个样本上滴加 100 μL 1×蛋白酶 K 工作液，37℃ 反应 10~20 min。  
**注：不同组织或物种的样本反应时间可能不同。建议进行预实验，确定反应时间。**
  - 4) 将通透好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

标记

1. 分组设置

| 分组   | 样本选择      | 特点                                                 | 目的                             |
|------|-----------|----------------------------------------------------|--------------------------------|
| 阳性对照 | 任选一张实验组切片 | <b>可选做</b> ，DNase I 处理切断 DNA，产生暴露的 3'-OH 末端，作为阳性样本 | 验证实验流程和试剂的有效性                  |
| 阴性对照 | 任选一张实验组切片 | <b>可选做</b> ，标记工作液中不含 TdT 酶                         | 排除样本自发荧光及样本和染色试剂的非特异性染色；调整曝光强度 |
| 实验组  | 待检测切片样本   | 必做，孵育标记工作液，保持实验检测条件的一致性                            | 实验数据来源                         |

\*TUNEL 检测时需设置阳性和阴性对照，以显示实验的客观性及准确性。建议在每次实验中设置阳性对照和阴性对照。

**注：阴性对照和阳性对照的制备可以同时进行。**

✧ 阳性对照

- 1) 滴加 100 μL 1×DNase I Buffer 工作液到已通透的样本上，室温平衡 5 min。
- 2) 用吸水纸去除样本上多余的液体。加入 100 μL 稀释后的 DNase I 工作液（200 U/mL），37℃ 孵育 10~30 min。
- 3) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

✧ 阴性对照

- 1) 滴加 100 μL 1×DNase I Buffer 工作液到已通透的样本上，室温平衡 5 min。
- 2) DNase I Buffer 孵育阴性样本，37℃ 孵育 10~30 min。
- 3) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

✧ 实验组

- 1) 实验组通透完成后在 PBS 中静置，等待阳性对照和阴性对照处理后共同进行标记染色。

2. 标记工作液的配制

计算好样本量集中配置，每个样本用量按照下表配制，充分混匀，现用现配。

| 组分                       | 阳性对照/实验组 | 阴性对照  |
|--------------------------|----------|-------|
| TdT Equilibration Buffer | 35 μL    | 40 μL |
| Labeling Solution        | 10 μL    | 10 μL |
| TdT Enzyme               | 5 μL     | 0 μL  |

**注：**

- 1. TdT Equilibration Buffer 使用前，室温静置直至完全溶解。冰冻的平衡液融化后可能会出现盐结晶，此为正常现象，可在使用前涡旋混匀。
- 2. Labeling Solution 使用前，请置于冰上溶解，待完全溶解后离心，并用枪头吹打混匀。
- 3. TdT Enzyme 对温度较敏感，请严格保存于-20℃，使用前取出，使用后立即放回。
- 4. 配制标记工作液时，建议不要涡旋。
- 5. 50 μL 标记工作液可覆盖的样本面积约为 5 cm<sup>2</sup>，对于表面积更大的样本可以成比例的增加工作液体积。

3. 标记步骤

- 1) 每个样本滴加 100 μL TdT Equilibration Buffer，37°C 湿盒中平衡 10~30 min。
- 2) 吸水纸吸除 TdT Equilibration Buffer（注意不要干片）。每个样本滴加 50 μL 标记工作液，放入湿盒中 37°C 避光反应 60 min。  

注：如果信号强度较弱，则可延长 DNA 标记反应的培养时间。某些系统可能需要在 37°C 下反应 4 小时。
- 3) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 4) 吸水纸吸干水分后滴加 DAPI 工作液，室温避光孵育 5 min，对细胞核进行复染。
- 5) 样本浸入 PBS 漂洗 4 次，每次 5 min。
- 6) 用吸水纸吸干多余的液体，用含抗荧光淬灭剂（自备）的封片剂封片。

检测

在荧光显微镜下选择合适的滤光片观察结果。

| 货号      | Dye             | Ex/Em (nm) | Filter Set       |
|---------|-----------------|------------|------------------|
| GCQ0048 | FITC            | 490/520    | FITC Filter Set  |
| GCQ0049 | Elab Fluor® 488 | 495/519    | FITC Filter Set  |
| GCQ0050 | Elab Fluor® 594 | 590/617    | TRITC Filter Set |
| GCQ0051 | Elab Fluor® 647 | 650/665    | Cy5 Filter Set   |
| GCQ0052 | Elab Fluor® 555 | 555/565    | TRITC Filter Set |
| DAPI    |                 | 350/470    | DAPI Filter Set  |

注：荧光易淬灭，请尽快观察拍照。若无法立即观察，请于 4°C 避光保存。

常见问题及解决方案

| 现象     | 可能原因        | 建议                                        |
|--------|-------------|-------------------------------------------|
| 非特异性染色 | TdT 酶的浓度过高。 | 用 TdT Equilibration Buffer 以 1:2~1:10 稀释。 |

|         |   |                                                  |                                                    |
|---------|---|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 非特异性染色  | 色 | TdT 酶反应时间过长或 TdT 酶反应过程中反应液渗漏，细胞或组织表面不能保持湿润。      | 注意控制反应时间，并确保 TdT 酶反应液能很好地覆盖样品。                     |
|         |   | 光照紫外线导致包埋试剂的聚合（如：甲基丙烯酸会导致样本 DNA 的断裂）。            | 尝试改用其它包埋材料或其它聚合试剂。                                 |
|         |   | 在固定组织时样本 DNA 已断裂（内源核酸酶的作用）。                      | 确保样品取样后立即固定或通过肝静脉灌注固定。                             |
|         |   | 使用了不适当的固定液，例如一些酸性固定液。                            | 采用推荐的固定液。                                          |
|         |   | 固定后某些核酸酶活性依然较高导致 DNA 断裂。                         | 用含有 dUTP 和 dAPT 的溶液封闭。                             |
| 标记率低    |   | 如果以乙醇或甲醇固定的样本则标记效率较低（因为在固定时染色质未能与蛋白质交联，而在操作中丢失）。 | 用溶于 PBS pH7.4 中的 4%多聚甲醛固定或福尔马林或戊二醛固定。              |
|         |   | 固定时间过长，导致交联程度过高。                                 | 减少固定时间，或用溶于 PBS pH7.4 的 2%多聚甲醛固定。                  |
|         |   | 石蜡切片脱蜡不充分。                                       | 1.延长脱蜡时间；<br>2.更换新的脱蜡液。                            |
|         |   | 荧光淬灭。                                            | 注意避光操作。                                            |
|         |   | 通透条件不佳，以致于试剂不能到达靶分子或浓度过低。                        | 1.增加通透时间；<br>2.优化蛋白酶 K 的作用浓度和作用时间。                 |
| 荧光背景高   |   | 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。                           |
|         |   | TdT 酶的浓度过高或反应时间过长。                               | 用 TdT Equilibration Buffer 作 1:2~1:10 稀释或注意控制反应时间。 |
|         |   | 红细胞中血红蛋白导致的自发荧光产生严重干扰。                           | 可选择其它细胞凋亡检测试剂盒。                                    |
| 阳性对照无信号 |   | DNase I 工作液的浓度过低。                                | 增加 DNase I 工作液浓度。                                  |
|         |   | 蛋白酶 K 洗涤不充分。                                     | 增加洗涤次数或延长洗涤时间。                                     |
|         |   | 细胞样本中，0.2%Triton X-100 没充分混匀。                    | 提前 1~2 天配制 0.2%Triton X-100。                       |

|        |                  |                |
|--------|------------------|----------------|
| 组织样本脱落 | 组织样本被酶从载玻片上消化下来。 | 降低蛋白酶 K 的处理时间。 |
|--------|------------------|----------------|

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 洗涤过程应充分洗涤，否则会影响后续实验中酶的活性（如 DNase I 和 TdT 酶）。用 PBS 清洗样本后，请用吸水纸吸干样本周围的液体。
4. 实验过程中请保持样本的湿润，防止干片造成的实验失败。
5. 荧光标记液和 TdT 酶避免反复冻融，建议不要涡旋。
6. 本说明书中推荐的条件是通用的，用户可根据不同的样本类型和预实验的结果，对样本处理时间、试剂浓度等条件进行优化，选择最合适的实验条件。

操作视频二维码（微信扫码观看）



石蜡切片操作视频



冰冻切片操作视频



细胞爬片操作视频