

Elabscience® One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit

货号：E-CK-A320/E-CK-A321/E-CK-A322/E-CK-A324/E-CK-A325
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/ E-CK-A321D/ E-CK-A322D/ E-CK-A324D/ E-CK-A325D*	Labeling Solution(FITC)/ Labeling Solution(Elab Fluor® 488)/ Labeling Solution(Elab Fluor® 594)/ Labeling Solution(Elab Fluor® 647)/ Labeling Solution(Elab Fluor® 555)	100 μL×2	100 μL×5	100 μL×10	-20 ℃ shading light
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 high 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

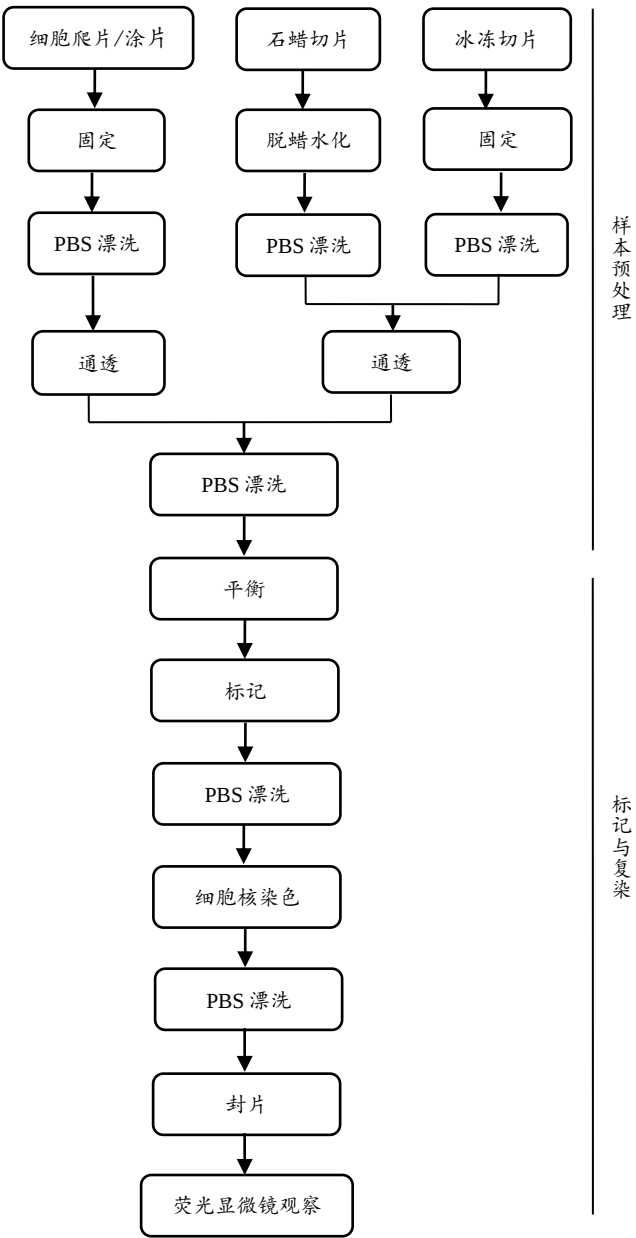
保存条件

-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、ddH₂O、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 ddH₂O 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 | 可选做，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 | 可选做，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钴盐结晶，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 cm²，对于表面积更大的样本可以成比例的增加工作液体积。
- 2

3. 标记步骤

- 1) 每个样本滴加 100 μL TdT Equilibration Buffer，37℃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℃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℃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
E-CK-A320	FITC	490/520	FITC Filter Set
E-CK-A321	Elab Fluor® 488	495/519	FITC Filter Set
E-CK-A322	Elab Fluor® 594	590/617	TRITC Filter Set
E-CK-A324	Elab Fluor® 647	650/665	Cy5 Filter Set
E-CK-A325	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℃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。
	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。

非特异性染色	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； 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； 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