



一步法原位 TUNEL 凋亡检测试剂盒

One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit

品名	货号	规格
一步法原位 TUNEL 凋亡检测试剂盒 One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit	JXF60161	20TEST

产品组分

产品编号	产品名称	20 Assays	Storage
JXF60161-A	TdT Equilibration Buffer	4 mL	-20°C
JXF60161-B	TdT Enzyme	100 μL	-20°C
JXF60161-C	Proteinase K (100×)	20 μL	-20°C
JXF60161-D	Labeling Solution(AF 488)	100 μL×2	-20°C
JXF60161-E	DNase I (20 U/μL)	5 μL	-20°C
JXF60161-F	DNase I Buffer (10×)	300 μL	-20°C
JXF60161-G	DAPI Reagent(25 μg/mL)	100 μL	-20°C

产品简介

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°C 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°C 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%。

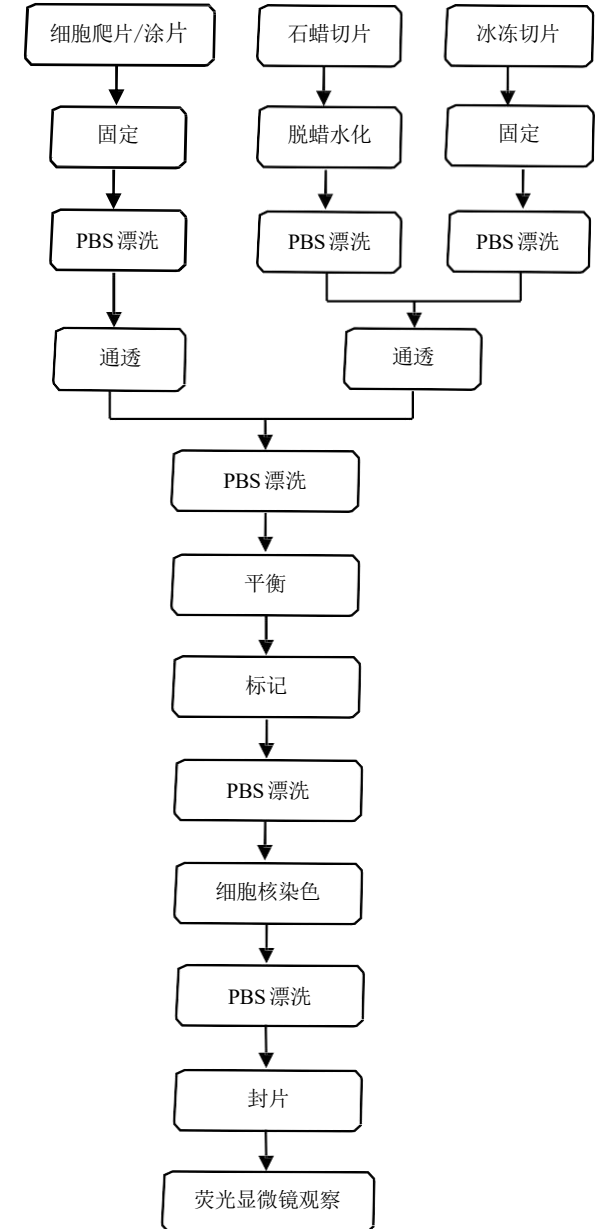
4) 其他试剂：

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



样本预处理

标记与复染

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°C 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°C 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°C 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°C**

- 时, 二甲苯脱蜡时间可延长至 20 min。脱蜡好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。
- 2) 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°C 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。**
- 3) 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°C) 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°C 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°C 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°C 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°C, 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 μ L 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 μ L 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
JXF60161	AF 488	495/519	FITC 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。
	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。
荧光背景高	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。
	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。
阳性对照无信号	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。
	DNase I 工作液的浓度过低。	增加 DNase I 工作液浓度。
组织样本脱落	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。

