

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

## Elabscience® One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit

产品货号: E-CK-A320/E-CK-A321/E-CK-A322/E-CK-A324/E-CK-A325

产品规格: 20 Assays/50 Assays/100 Assays

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

销售部电话                    027-87879180, 027-87854967

技术部电话                    15623126501, 027-65521719

电子邮箱（销售）            [Perry@elabscience.cn](mailto:Perry@elabscience.cn)

电子邮箱（技术）            [Flow@elabscience.cn](mailto:Flow@elabscience.cn)

网址                              [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 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

## 产品组分

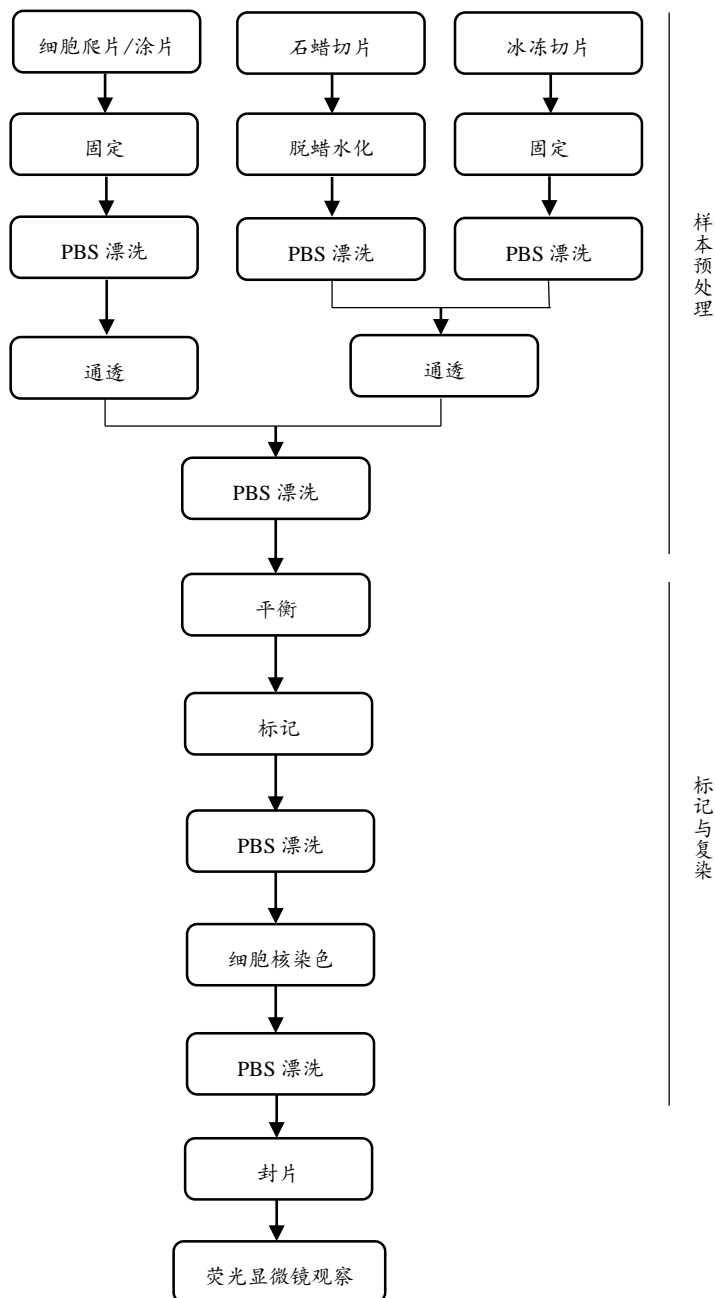
产品编号	产品名称	20 Assays	50 Assays	100 Assays	Storage
E-CK-A32A	TdT Equilibration Buffer	4 mL	9 mL	9 mL×2	-20 °C
E-CK-A32B	TdT Enzyme	100 μL	250 μL	250 μL×2	-20 °C
E-CK-A32C	Proteinase K (100×)	20 μL	50 μL	100 μL	-20 °C
E-CK-A320D/ E-CK-A321D/ E-CK-A322D/ E-CK-A324D/ E-CK-A325D*	Labeling Solution(FITC)/ Labeling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

\*Labeling Solution 每个货号对应的荧光素不同。

## 保存条件

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

## 实验流程



## 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。

## 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。现用现配。

### 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。现用现配。

**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。现用现配。

## 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 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

### ➤ 预备步骤

#### 1. (可选做) 阳性、阴性对照的设置

*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。

##### 1) 阳性对照

- 滴加 100  $\mu\text{L}$  1 $\times$ DNase I Buffer 工作液到已通透的样本上, 室温平衡 5 min。
- 用吸水纸去除样本上多余的液体。加入 100  $\mu\text{L}$  稀释后的 DNase I 工作液 (200 U/mL), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10~30 min。
- 样本浸入 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。

##### 2) 阴性对照

- 滴加 100  $\mu\text{L}$  1 $\times$ DNase I Buffer 工作液到已通透的样本上, 室温平衡 5 min。
- DNase I Buffer 孵育阴性样本, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10~30 min。
- 样本浸入 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。

#### 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	阴性对照
TdT Equilibration Buffer	35 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
Labeling Solution	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
TdT Enzyme	5 $\mu\text{L}$	0 $\mu\text{L}$

**注:**

- 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。使用前涡旋混匀。
- Labeling Solution** 使用前, 请置于冰上溶解, 待完全溶解后离心, 用枪头吹打混匀。

- c) 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。
- d) 配制标记工作液时，建议不要涡旋。
- e) 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。

### ➤ 标记步骤

1. 每个样本滴加 100 μL TdT Equilibration Buffer，37℃ 反应 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 <sup>®</sup> 488	495/519	FITC Filter Set
E-CK-A322	Elab Fluor <sup>®</sup> 594	590/617	TRITC Filter Set
E-CK-A324	Elab Fluor <sup>®</sup> 647	650/665	Cy5 Filter Set
E-CK-A325	Elab Fluor <sup>®</sup> 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。
	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