

## 一步法TUNEL原位细胞凋亡检测试剂盒(绿色, PriFluor 488)

货号: P-CA-302

### 产品简介

一步法 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒是一款灵敏度高且能快速简便地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

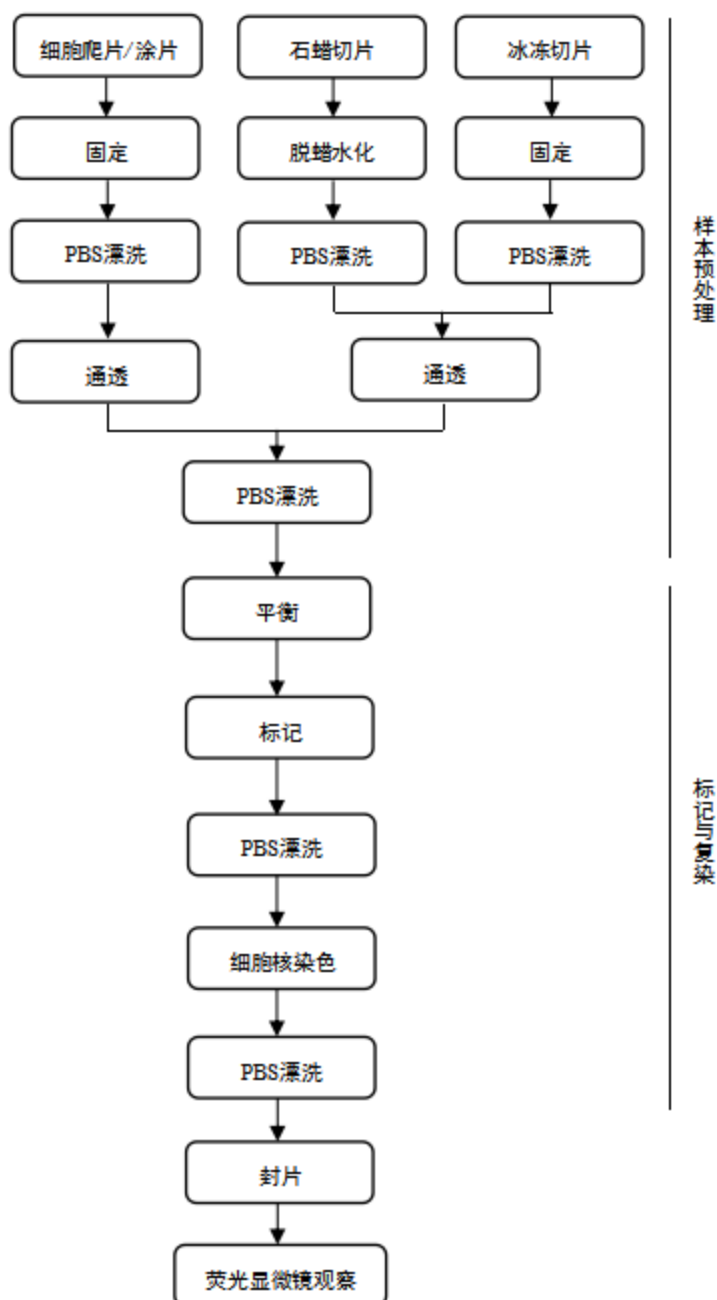
产品名称	20Assays	50Assays	100Assays	Storage
TdT Equilibration Buffer	4 mL	9 mL	9 mL×2	-5~-20°C
TdT Enzyme	100 μL	250 μL	250 μL×2	-5~-20°C
Proteinase K (100×)	20 μL	50 μL	100 μL	-5~-20°C
Labeling Solution(PriFluor 488)	100 μL×2	100 μL×5	100 μL×10	-5~-20°C, 避光
DNase I (20 U/μL)	5 μL	13 μL	25 μL	-5~-20°C
DNase I Buffer (10×)	300 μL	700 μL	1500 μL	-5~-20°C
DAPI Reagent(25 μg/mL)	100 μL	250 μL	500 μL	-5~-20°C, 避光
说明书			一份	

### 保存条件

-5~-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°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、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°C 固定 1~2 h。

2) 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。**



- 3) 固定好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。
- 4) 将样本浸入通透液 (自备) 中, 37°C 作用 10 min。
- 5) 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。

- 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  $\mu$ L 1 $\times$ 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。
- 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°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  $\mu$ L 1 $\times$ 蛋白酶 K 工作液, 37°C 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

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

##### 2) 阴性对照

- a) 滴加 100  $\mu$ L 1 $\times$ DNase I Buffer 工作液到已通透的样本上, 室温平衡 5 min。
- b) DNase I Buffer 孵育阴性样本, 37°C 孵育 10~30 min。
- c) 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。
- TdT Enzyme 对温度较敏感，请严格保存于-5~-20°C，使用前取出，使用后立即放回。
- 配制标记工作液时，建议不要涡旋。
- 50  $\mu\text{L}$  标记工作液可覆盖的样本面积约为 5  $\text{cm}^2$ ，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

- 每个样本滴加 100  $\mu\text{L}$  TdT Equilibration Buffer，37°C 反应 10~30 min。
- 吸水纸吸除 TdT Equilibration Buffer（注意不要干片）。每个样本滴加 50  $\mu\text{L}$  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。

- 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 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。
- 样本浸入 PBS 漂洗 4 次，每次 5 min。
- 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。

Dye	Ex/Em (nm)	Filter Set
PriFluor 488	495/519	FITC 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。
	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。

普诺赛® | Pricella  
Procell

普诺赛® | Pricella  
Procell

普诺赛® | Pricella  
Procell

