

一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)

Cat. No:PBPA005

Size: 20T/50T/100T

产品编号	产品名称	50T	100T	Storage
PBPB024	TdT Equilibration Buffer	9ml	9ml×2	-20℃
PBPB025	TdT Enzyme	250 μl	250 μl×2	-20℃
PBPB026	Proteinase K (100×)	50 μl	100 μl	-20℃
BPBB027	Labeling Solution(FITC)	100 μl×5	100 μl×10	-20℃
	说明书		一份	

保存条件

-20° C 可保存一年, Labeling Solution 需避光保存。

检测原理

细胞凋亡中染色体 DNA 的断裂是个渐进的阶段过程。染色体 DNA 首先在内源性的核酸水解酶的作用下降解为 50-300kb 的大片段, 然后大约 30%的染色体 DNA 在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶作用下, 在核小体单位之间被随机切断, 形成 180-200 bp 核小体 DNA 多聚体。因此在细胞凋亡晚期, DNA 会被降解为 180-200 bp 的片段, 断裂的基因组 DNA 上暴露出大量的 3'-OH 末端。末端脱氧核糖核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT)是一种不依赖于模板的 DNA 聚合酶, 可以催化脱氧核苷酸结合到断裂的 DNA 分子 3'-OH 末端。因此 TUNEL(TdT mediated dUTP Nick End Labeling)细胞凋亡检测试剂盒可以用来检测组织细胞在凋亡晚期过程中细胞核 DNA 的断裂情况。其原理是在 TdT 酶的作用下, 在基因组 DNA 断裂时暴露出的 3'-OH 末端掺入荧光素标记的 dUTP (FITC-12-dUTP), 从而可以用荧光显微镜检测。本试剂盒应用范围广, 适用于石蜡组织切片, 冰冻组织切片、细胞爬片、细胞涂片的细胞凋亡检测。

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：

电话：400-669-2220 13437835247 (微信同号)

官网：<http://www.perseebio.com.cn>

地址：北京市大兴区黄村镇观音寺南里海北路 1 号



PBS、ddH₂O、含抗荧光淬灭剂的封片液（推荐 PBPB021）。

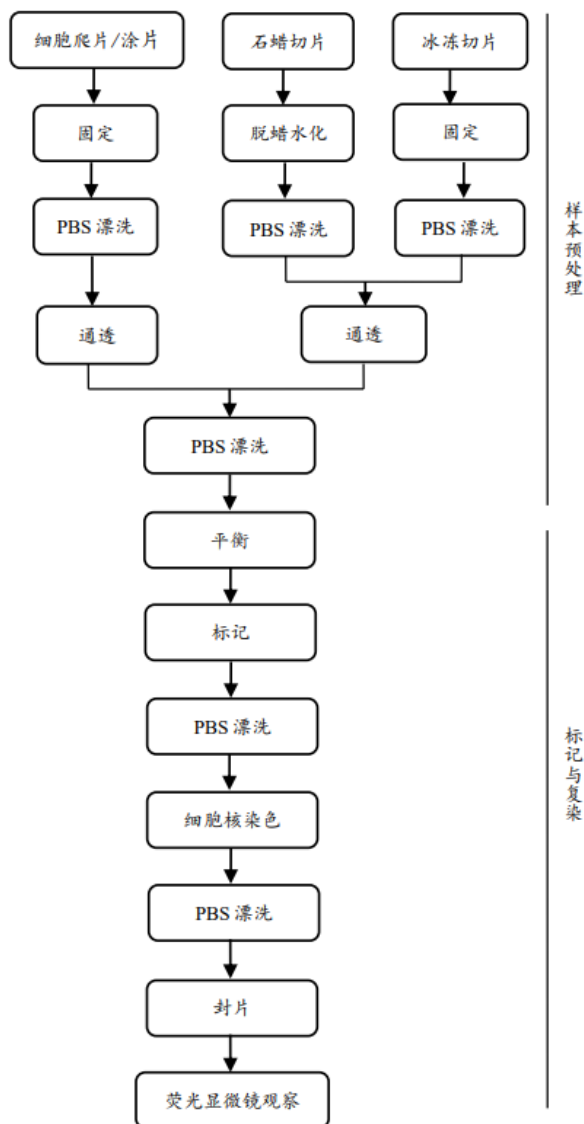
5) 仪器：

荧光显微镜。

6) 如需染核，需自备 DAPI 染色液（推荐 PBPB020）；

如需阳性对照实验，需自备 TUNEL 检测阳性对照制备试剂盒（推荐 PBPA006）

实验流程



试剂配制

电话：400-669-2220 13437835247（微信同号）

官网：<http://www.perseebio.com.cn>

地址：北京市大兴区黄村镇观音寺南里海北路1号

- 1) **1×蛋白酶 K 工作液**: 取 1 μL Proteinase K (100×) 加 99 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 10min; 无水乙醇 (自备) 浸泡切片 2 次, 每次 5min; 90%、80%、70% 的乙醇水溶液 (自备) 各一次, 每次 3min。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 20min。
2) 脱蜡好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次, 每次 5min。
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 5min。

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。

- 5) 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	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	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。

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 (选做) / 实验组	阴性对照 (选做)
TdT Equilibration Buffer	35 μ l	40 μ l
Labeling Solution (FITC)	10 μ l	10 μ l
TdT Enzyme	5 μ l	0 μ l

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°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 μ L 标记工作液可覆盖的样本面积约为 5 cm^2 , 对于表面积更大的样本可以成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)
BPBB027	Labeling Solution(FITC)	490/520
PBPB020	DAPI 染色液	350/470

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。