北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话：400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒

One-Step Universal TUNEL Apoptosis Kit

产品说明：

细胞发生凋亡时，会激活一些 DNA 内切酶，这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA, 产生180 bp-200 bp 的 DNA 片段，表现为琼脂糖凝胶电泳中呈现的特异的梯状 Ladder 图谱。基因组 DNA 双链或单链断裂时会出现产生大量的粘性3'-OH 末端，可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的催化作用下，与 YFe-dUTP 结合，从而通过荧光显微镜或流式细胞仪直接进行凋亡细胞的检测，这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(Terminal -deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling,TUNEL)。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂，因而没有3'-OH 形成，很少能够被染色。Tunel 法可以对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色，能准确地反应细胞凋亡典型的生物化学和形态特征，可检测出极少量的凋亡细胞，因而在细胞凋亡的研究中广泛采用。本试剂盒应用范围广，可用于检测冷冻或石蜡切片中的细胞凋亡情况，也可检测培养的贴壁细胞或悬浮细胞的凋亡情况。可选择性的检测凋亡细胞，而非坏死细胞或因辐照和药物治疗而造成的 DNA 链断裂的细胞。本试剂盒检测细胞凋亡，耗时短，只需一步染色反应，洗涤后即可检测。

储运条件：-20℃保存，组分B需避光，避免反复冻融。冰袋运输。

试剂盒组份：

产品编号	产品名称	规格/价格	规格/价格	
A14090	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色)	20T	50T	
产品组分编号	**产品组份名称**	**包装**	**包装**	**保存**
A	TUNEL Equilibration Buffer	2mL	5mL	
B	TUNEL Reaction Buffer(红色或绿色)	1mL	2x 1.25 mL	-20℃避光1年 避免反复冻融
C	TdT Enzyme	40μL	100μL	
D	Proteinase K(2mg/mL)	40μL	100μL	
E	DNasel(2 U/pL)	5μL	13μL	
F	10×DNase I Buffer	100 μL	260μL	

注意事项：

1) 荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
2) TUNEL Reaction Buffer使用时请佩戴口罩、手套，接触皮肤后，请立即有大量水冲洗。
3) 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
4) 染色背景较重或非特异性着色明显时可适当减少染色时间。
5) 实验时建议增加阴性对照和阳性对照组。
6) 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
7) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料：

PBS 缓冲液(1×, pH值约为7.4);0.4%Triton X-100(PBS 配制）；0.1%Triton X-100(PBS 配制，其中含5 mg/mL BSA); 4%多聚甲醛 (PBS 配制);免疫组化笔；脱蜡溶剂(石蜡切片样本);石蜡切片处理相关试剂；抗荧光淬灭封片剂； ddH20

实验设计

A. 阳性对照：DNase I 处理制备阳性对照载玻片。DNase I 可以消化单链或双链 DNA 暴露3'-0H 末端，人为造成细胞凋亡。每次实验做一次即可。(用来验证本次实验操作和试剂盒有无问题)

B. 阴性对照： 使用不含 TdT Enzyme 的 TUNEL Reaction Buffer, 用 dH20 替代 TdT Enzyme。(主要是排除细胞自身凋亡、操作过程等原因导致的非特异性染色；以及调整拍摄曝光强度。)

C. 实验处理组： 实验组按照说明书正常操作。

地址： 北京市海淀区丰慧中路7号新材料创业大厦 B 座327室. 邮编：100080

D. 实 验 对 照 组 ： 实验组按照说明书正常操作。

操作步骤

1. 样 本 准 备 ：

(1)对于贴壁细胞或细胞涂片

a.PBS 清 洗 1 次 。

注：如果担心细胞涂片的细胞贴得不牢，可以干燥样品使细胞贴得更牢。

b. 固定：加入适量4%多聚甲醛（PBS 配制），4℃固定30 min。PBS清 洗 2 次 。

c. 通透：加入适量0.4% Triton X-100(PBS 配制)，室温通透20 min。PBS 清 洗 2 次 。

d. 转步骤2. TUNEL 反应。

(2)对于悬浮细胞或细胞悬液

a. 收集细胞(3-5×106个细胞)，1000 rpm 离 心 5 min,PBS 清 洗 2 次 。

b. 固定：加入适量4%多聚甲醛 (PBS 配制)充分重悬细胞，4℃固定30 min。2000 rpm离 心 5 min,PBS 清 洗 2 次。

c. 通透：加入适量0.4% Triton X-100(PBS 配制)，室温通透20 min。2000 rpm 离 心 5 min,PBS 清 洗 2 次 。

d. 转步骤2. TUNEL 反应。

(3)石蜡组织切片

a.. 将石蜡切片置于切片架上，放置于60℃烘箱中烤片60 min。

b. 脱蜡与水化：将切片样本依次放入二甲苯I(10 min)→ 二甲苯II(10 min)→100% 乙 醇I(5min)→→100% 乙醇II(5 min)→95% 乙醇(5 min)→90% 乙 醇 （ 5 min)→80% 乙醇(5 min)→70% 乙醇(5 min)→dH20 冲洗5 min, 冲 洗 2 次 。

注：二甲苯有毒，易挥发，请在通风橱中进行此操作。

c. 用滤纸吸干切片样本周围液体，用免疫组化笔圈好样本轮廓，以便下游通透与标记。

注：若在后续实验操作中发现免疫组化笔画的轮廓圈被破坏，需及时补画。

d. 通透：按1:50的比例，将2 mg/mL 的Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度40μg/mL, 在每个样本上滴加100 L, 使溶液覆盖全部样本区域，37℃孵育30 min。

注：Proteinase K 可通透细胞膜和核膜，从而使后续步骤的染色试剂充分进入细胞核进行反应，提高标记效率。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载波片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到更好的结果，Proteinase K的浓度、孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化。

e. 将切片样本浸入1×PBS 漂洗三次，每次5 min, 用滤纸吸去多余的液体，将处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

注：这一步必须把 Proteinase K 洗涤干净，否则会严重干扰后续的标记反应。

f. 转步骤2. TUNEL 反应。

(4)冰冻组织切片

a. 固定：取出冰冻切片，并回温至室温。将切片样本浸入4%多聚甲醛 (PBS 配制)中，室温固定30 mmin。将切片样本浸入1×PBS 漂洗三次，每次10 min。

注：若是担心甲醛清洗不干净，影响最终染色效果。可在甲醛固定完成后加入适量2 mg/mL 甘氨酸清洗10 min, 中和残留的固定液，再进行PBS 清洗。

b. 用滤纸吸干切片样本周围液体，用免疫组化笔圈好样本轮廓，以便下游通透与标记。

注：若在后续实验操作中发现免疫组化笔画的轮廓圈被破坏，需及时补画。

c. 通透：按1:50的比例，将2 mg/mL的 Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度40 μg/mL, 在每个样本上滴加100μL, 使溶液覆盖全部样本区域，37℃孵育20 min。

注：Proteinase K 可通透细胞膜和核膜，从而使后续步骤的染色试剂充分进入细胞核进行反应，提高标记效率。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载波片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到更好的结果，Proteinase K的浓度、孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化。如优化 Proteinase K 的浓度与孵育时间仍无法改善染色效果，可选择将样本浸入1% Triton X-100(PBS 配制)中，室温促渗3-5 min; 之后将切片样本浸入1×PBS 漂洗三次，每次5 min。

d. 将切片样本浸入1×PBS 漂洗三次，每次5 min，用滤纸吸去多余的液体，将处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

注：这一步必须把 Proteinase K 洗涤干净，否则会严重干扰后续的标记反应。

e. 转步骤2. TUNEL 反应。

(5)阳性处理(仅阳性对照进行此步骤，其他样品直接进行TUNEL反应步骤)

a. 按1:10的比例用 ddH20 将10× DNase I Buffer 稀释成1× DNase I Buffer 备用。

b. 滴加100 μL1×DNase I Buffer 到已处理的样本上，覆盖全部样本区域，室温平衡5 min。

c. 用 1 × DNase I Buffer 以1:100稀释 DNase I(2 U/μL)至终浓度20 U/mL的工作液。

d. 弃去 Buffer, 加入100 μL 浓度为20 U/mL 的 DNase I 工作液，室温孵育15 min。

e. 弃去 DNase I 工作液，PBS 清洗 2 次 。

f. 转步骤2. TUNEL 反应。

2.TUNEL 反应

(1)配制TUNEL反应液(即用即配)：

	1个样本	5个样本	10个样本
TdT酶	2 μL	10 μL	20 μL
TUNEL Reaction Buffer	48 μL	240 μL	480 μL
TUNEL反应液总体积	50 μL	250 μL	500 μL

(2)对于贴壁细胞、细胞涂片或组织切片

a. 每个样本加入50 μL TUNEL 反应液，使反应液均匀覆盖样本。37℃避光孵育适宜的时间(细胞推荐染色时间15-30 min，组织染色时间推荐1 h)。

注：50 μL TUNEL 反应液适合涂片、切片或96孔板(其他不同孔板可以适当调整 TUNEL反应液体积，覆盖细胞即可)。如果待检测的样品为涂片、切片或在24孔板、12孔板或6孔板中，可以使用防蒸发膜，或自行尝试使用自封袋或者其它适当材料自行裁剪成比孔略小的圆形塑料片，滴加 TUNEL 反应液后覆盖在样品上，可以防止 TUNEL 反应液蒸发，并且使 TUNEL 反应液均匀覆盖样本。

b. 弃去 TUNEL 反应液，PBS 清洗2次后，再用0．1% Triton X-100(PBS 配制，其中含5 mg/mLBSA) 清洗3次，每次5 min，这样游离的未反应的标记物可以清除较干净。

c. (可选)每个样本加入适量浓度为5 μg/mL 的 DAPI 染液，室温避光孵育5 min。染色完成后，弃去 DAPI 染液，PBS 清洗 2 次 ， 每 次 5 min。

d. (可选)切片封片：每个样本滴加20 μL 抗荧光淬灭封片剂(抗荧光淬灭封片剂可能会不适用于某些染料，实验前建议进行预实验测试匹配性)，盖上盖玻片，用镊子的钝端轻轻敲击盖玻片，去除气泡以使封片完全。

e. 用滤纸吸去多余的液体，向样本区域加100 μL PBS 保持样本湿润，立即在荧光显微镜下观察。

(3)对于悬浮细胞或细胞悬液

a. 每个样本管加入50 μLTUNEL 反应液轻轻重悬细胞，37℃避光孵育15-30 min。每隔10 min用微量移液器轻轻重悬细胞。

b.2000 rpm 离心5 min，弃去 TUNEL 反应液，用0.1% Triton X-100(PBS 配制，其中含5 mg/mLBSA) 清洗 2 次 ， 每 次 5 min，这样游离的未反应的标记物可以清除较干净。

c. 每个样本管加入100 μL浓度为5 μg/mL 的 DAPI 染液，室温避光孵育5 min。

d. 加入400 μL PBS 重悬细胞，立即用流式细胞仪检测或进行涂片后在荧光显微镜下观察。

FAQ 常见问题：

1. 问：为什么出现了一些非特异标记?

答：1)有些细胞，比如平滑肌核酸酶或聚合酶活性水平较高，使得 DNA 全部被切断，易导致假阳性。建议：取出细胞后要立即固定并充分固定，以阻止这些酶的活性，同时设置阴性对照.

2) 固定液浓度过高或过低，导致中心部分细胞固定效果不佳，而使得中心部细胞自溶、DNA 链出现不规则断裂，产生假阳性。建议：推荐使用

4%多聚甲醛。

3)TdT 酶反应时间过长或 Tunel 反应过程中反应液发生蒸发或渗漏，细胞表面不能保持湿润。注意控制反应时间，并确保 TdT 酶反应液能很好地覆盖样品。

4)有些试剂或细胞存在自发荧光，选择染料时要避开自发荧光的颜色。

2. 问：为什么没有染上荧光?

答：1)固定不充分。固定液首选4%多聚甲醛，现用现配。不建议使用乙醇，乙醇固定液的渗透力较弱，影响 TUNEL 标记效率。

2) 细胞膜和核膜的通透不充分，TdT 酶未能到达核内。细胞可用0.2% Triton X-100溶液通透5-30 min, 不同的细胞所需要的通透时间略有不同，适当调整。

3)延长标记时间至2 h, 并适当增加 TdT 酶及 dUTP 的用量。

4)确定实验对象细胞有凋亡。准备一份 DNase I 处理的阳性对照，验证 TdT 酶反应是否正确进行。

3. 问：如何对细胞核进行复染?

答：可在 TUNEL 反应结束后对细胞核进行染色。

4. 问：为什么荧光背景高?

答：1)支原体污染：可以使用支原体染色检测试剂盒验证。

2)TdT 酶反应时间过长，可以用试剂盒提供的 TdT 酶稀释液将TdT 酶稀释2-5倍后再按照说明书操作，稀释后的TdT 酶仅供当日使用。

3)处于高速分裂和增殖状态中的细胞，有时也会出现细胞核中的 DNA 断裂。建议：在非高增殖期取样检测；

4)有些试剂或细胞存在自发荧光，选择染料时要避开自发荧光的颜色。

5)DAB 孵育时间过长，减少 DAB 染色时间。

6)Biotin-X-dUTP 的非特异性结合，在 TdT 酶反应之后，再用含0.1% Triton X-100 和 1 mg/ml BSA 的 PBS 洗三次。

5. 问：标记率低?

答：1)乙醇、甲醇或甲醛(市面上购买的甲醛大多含有甲醇)固定的样品标记效率较低(因为在固定时染色质未能与蛋白质交联，而在操作中丢失)，采用推荐的固定液。

2)固定时间过长，导致交联程度过高，减少固定时间。

3)贴壁细胞如果使用药物诱导凋亡，会细胞皱缩，贴壁黏附力降低，导致凋亡细胞容易脱落。建议：在凋亡诱导结束后，可以对多孔 板进行1000g 离心5 min, 然后再吸出培养基并用 PBS 洗涤。如果没有适合的离心机，请注意操作轻缓，防止发生凋亡的细胞在洗涤时被洗去。后续整个操作也需要轻缓。