

一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

货号: KTA2010

规格: 20 T/50 T/100 T

批号: 见产品标签

	应用实验: 适用细胞及组织样本的流式细胞术、荧光检测等实验
	荧光激发/发射: Ex/Em=490 nm/520 nm
	保质期: -20℃, 避光保存 12 个月

01 背景与原理

细胞凋亡中, 染色体 DNA 双链断裂或单链断裂而产生大量的粘性 3'-OH 末端, 可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的作用下, 将脱氧尿苷三磷酸核苷酸 (dUTP) 和荧光素形成的衍生物标记到 DNA 的 3'-末端, 从而可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。由此, TUNEL 成为了检测 DNA 片段化 (细胞凋亡) 的最常用方法。

一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (绿色荧光) 提供实验所需的全套试剂组分以及优化的实验方案, 适用于荧光酶标仪、荧光显微镜、流式细胞仪。适用于如下样品类型: 贴壁细胞, 悬浮细胞, 石蜡包埋组织切片, 冰冻切片。荧光信号检测通道为绿色通道 (Ex/Em=490 nm/520 nm)。

02 包装清单

试剂盒组分	规格			储存要求
	20T	50 T	100 T	
TdT Enzyme	40 µL	100 µL	200 µL	-20℃
Equilibration Buffer (5×)	0.8 mL	2 mL	4 mL	-20℃
Label Mix Green	4 µL	10 µL	20 µL	-20℃, 避光保存
Probe Diluent	0.2 mL	0.5 mL	1 mL	-20℃
DAPI (500×)	5 µL	12 µL	24 µL	-20℃, 避光保存
BSA Working Solution	6 mL	15 mL	30 mL	-20℃
TritonX-100 (100%)	100 µL	100 µL	100 µL	4℃
DNase I (5 U/µL)	4 µL	10 µL	10 µL	-20℃
10×DNase I Buffer	0.3 mL	0.6 mL	0.6 mL	-20℃
Proteinase K (20mg/mL)	4 µL	10 µL	20 µL	-20℃
Tissue Autofluorescence Quencher	2 mL	5 mL	10 mL	常温, 避光保存

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	荧光显微镜、流式细胞仪	荧光信号检测通道为 FITC 通道
耗材	细胞培养板	/
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）、4%多聚甲醛、去离子水；石蜡切片时需要二甲苯和乙醇；镜检之前需要水性封固剂或抗荧光淬灭剂	/
其他	离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Working Label Mix Green	即用型；用 Probe Diluent 将 Label Mix Green 稀释 25 倍得到 Working Label Mix Green	根据实际用量，未用完的 Working Label Mix Green 于-20℃避光分装保存 3 个月，避免反复冻融。
DAPI (1×)	即用型；用 PBS 将 DAPI (500×)稀释成 DAPI (1×)。	根据实际用量
TritonX-100 (0.3%)	即用型；用 PBS 将 100% TritonX-100 稀释成 0.3% TritonX-100。	根据实际用量
1×Equilibration Buffer	即用型；用去离子水将 5×Equilibration Buffer 稀释成 1×Equilibration Buffer。	根据实际用量，用于标记前平衡样本。
1×DNase I Buffer	即用型；用去离子水将 10×DNase I Buffer 稀释成 1×DNase I Buffer。	根据实际用量
Tissue Autofluorescence Quencher	即用型；能够显著淬灭脂褐素引起的自发荧光。	使用完后拧紧瓶盖防止挥发

05-2 实验步骤

05-2-1 样本处理

1. 对于贴壁细胞（通过荧光显微镜分析）

- (1) 将细胞爬片放入细胞培养板中，接种细胞进行培养，至少 24 h。通过所需方法诱导细胞凋亡，同时培养无诱导的对照组细胞。
- (2) 除去培养基，在室温下用 50 μL 4%多聚甲醛固定细胞 30 min。
- (3) 除去固定液并用 200 μL PBS 浸洗 3 次，每次 5 min。
- (4) 固定后，每孔添加 50 μL 0.3% Triton X-100，并在室温下孵育 30 min。
- (5) 除去通透剂，用 50 μL BSA Working Solution 洗涤细胞 2-3 次，用 1mL PBS 洗涤细胞 2-3 次。进行荧光显微镜分析（继续进行步骤 05-2-2 的荧光显微镜分析）。

注意：

1) 对于细胞爬片及其他孔板细胞，可依据实际情况调整固定液和通透剂体积。

2) 可在第(5)步后通过用 **DNase I** 处理样本引起 **DNA** 断裂来制备选做的阳性对照。阳性对照的设置，样本制备完成后，在室温条件下可用 **10 U/mL** 的 **DNase I**（按 1: 500 的比例，用 **1×DNase I Buffer** 将 **5 U/μL** 的 **DNase I** 稀释成 **10 U/mL**）消化细胞或组织 **10-20 min** 后，样本用 **PBS** 洗涤 3 次，每次 **5 min**，然后再进行荧光显微镜分析，如果是组织切片样本，建议阳性对照后续操作在单独的染色缸中染色和洗涤。

2. 对于非贴壁细胞（通过流式细胞仪分析）

(1) 培养细胞至最佳密度（约 $1-2 \times 10^6$ 细胞/mL），通过所需方法诱导细胞凋亡，同时培养无诱导的对照培养物。

(2) 以 **300 g** 离心并收集细胞（ $1-5 \times 10^6$ ），用 **PBS** 洗涤 2 次。

(3) 加入 **1 mL 4%** 多聚甲醛，在室温下孵育 **30 min**。

(4) 以 **300 g** 离心细胞，除去上清液，重悬于 **1 mL PBS** 中，重复洗涤 2 次。

(5) 以 **300 g** 离心细胞，除去上清液，在室温下，用 **500 μL 0.3% Triton-X 100** 重悬细胞 **5 min** 使其通透（或者将细胞在 **100 μg/mL** 蛋白酶 **K** 的 **PBS** 中重悬 **5 min** 使其通透）。

(6) 以 **300 g** 离心细胞，除去上清液，重悬于 **1 mL PBS** 中。重复洗涤 2 次，然后进行流式细胞仪分析（继续进行步骤 **05-2-2** 的流式细胞仪分析）。

注意：可在第(6)步后通过用 **DNase I** 处理样本引起 **DNA** 断裂来制备选做的阳性对照。**DNase I** 处理的详细步骤可参考 **05-2-1** 中第 1 点贴壁细胞样本处理中的注意事项 2)。

3. 对于石蜡包埋的组织切片（通过荧光显微镜分析）

(1) 将组织在二甲苯浸泡 2 次，每次 **10-20 min** 进行脱蜡。

(2) 通过以下步骤（按给定顺序）为组织复性：在 **100%乙醇** 中 2 次洗涤，每次 **5 min**，然后依次在 **95%**，**70%** 和 **50%乙醇** 中各洗涤 1 次，每次 **3 min**。

注意：也可按自己实验室组织脱蜡、复性体系进行操作。

(3) 用适量的 **PBS** 浸洗样品 2 次，每次 **5 min**。

(4) 排出组织中多余的 **PBS**，切片稍甩干后，用组化笔在组织周围画圈，并在 **20 μg/mL Proteinase K**（在 **PBS** 中，现配现用）溶液中室温孵育 **8-10 min**，**100-200 μL Proteinase K** 溶液覆盖住组织即可。

注意：必须针对特定组织类型和厚度优化蛋白酶消化时间。蛋白酶过度消化将导致细胞结构丧失，组织切片可能会从玻片上脱落。消化不充分会导致 **TdT** 标记不彻底。

(5) 用适量的 **PBS** 浸洗样品 3 次，每次 **5 min** 来终止 **Proteinase K** 消化作用，进行荧光显微镜分析（继续进行步骤 **05-2-2** 的荧光显微镜分析）。

注意：可在第(5)步后通过用 **DNase I** 处理样本引起 **DNA** 断裂来制备选做的阳性对照。**DNase I** 处理的详细步骤可参考 **05-2-1** 中第 1 点贴壁细胞样本处理中的注意事项 2)。

4. 对于冰冻组织切片（通过荧光显微镜分析）

(1) 将切片在玻片上干燥后，在室温下用 **200 μL 4%** 多聚甲醛固定 **30 min**。

(2) 用适量的 **PBS** 浸洗 2 次，每次 **5 min**。

(3) 去除组织中多余的 **PBS**，切片稍甩干后，用组化笔在组织周围画圈，并在 **20 μg/mL Proteinase K**（在 **PBS** 中，现配现用）溶液中室温孵育 **8-10 min**，**100-200 μL Proteinase K** 溶液覆盖住组织即可。

(4) 用适量的 PBS 浸洗样品 3 次，每次 5 min 来终止 Proteinase K 消化作用，进行荧光显微镜分析（继续进行步骤 05-2-2 的荧光显微镜分析）。

注意：

- 1) 组织切片会产生自发荧光，可使用组织自发荧光淬灭剂进行处理。
- 2) 可在第(4)步后通过用 DNase I 处理样本引起 DNA 断裂来制备选做的阳性对照。DNase I 处理的详细步骤可参考 05-2-1 中第 1 点贴壁细胞样本处理中的注意事项 2)。

05-2-2 TUNEL 分析

1. 荧光显微镜分析

(1) 根据要分析的样品数量，在使用前准备 TdT 标记反应缓冲液：

反应组分	每孔体积 (μL)
去离子水	33
Equilibration Buffer (5×)	10
Working Label Mix Green	5
TdT Enzyme	2
总体积	50

注意：配制 TdT 标记反应缓冲液之前，将各组分平衡至室温，Equilibration Buffer (5×)母液因低温保存，会出现少量成分析出的现象，请颠倒混匀后使用，可最后加 TdT Enzyme。Equilibration Buffer (5×)中含有高毒性化学物质二甲肼酸钠和氯化钴，皮肤接触后，立即用大量水冲洗。万一发生事故或感到不适，请立即就医。使用时请勿饮酒，饮食或吸烟。

(2) 向每个样品中加入 50 μL（96 孔板推荐 50 μL，24 孔板推荐 200 μL，切片建议添加 50-200 μL，可依据样本特性及面积大小适当调整试剂体积，覆盖住组织即可）1×Equilibration Buffer，室温避光孵育 5 min。

(3) 除去 1×Equilibration Buffer，向每个样品中加入 50 μL（96 孔板推荐 50 μL，24 孔板推荐 200 μL，切片建议添加 50-200 μL，可依据样本特性及面积大小适当调整试剂体积，覆盖住组织即可）反应混合物，并在湿盒中 37℃下避光孵育 1-2 h (不同的样本，可视情况调整孵育时间)。

注意：湿盒底部需要加入适量超纯水以在孵育过程中保持湿润，从而尽量减少 TUNEL 检测液的蒸发。

(4) 用 PBS 将样品浸洗 3 次，每次 5 min。

(5) 用 1×DAPI 孵育 10 min 对样品进行复染。

注意：如需计算凋亡细胞比例，建议复染，根据染色组织的不同，复染浓度可能需要调整。DAPI 过度染色可能导致难以观察荧光素标记。

(6) 用适量的 PBS 浸洗样品 3 次，每次 5 min。

(7) 组织自发荧光淬灭，对于组织样本，添加 Tissue Autofluorescence Quencher 室温避光孵育 5 min，去离子水浸洗 5 min 后 PBS 浸洗 3 次，每次 5 min。

注意：1.组织切片会产生自发荧光，仅组织样本需要淬灭自发荧光，Tissue Autofluorescence Quencher 处理后组织会染成蓝色，也会一定程度降 Tunel 的荧光强度，但不影响荧光显微镜拍照；2.需精确组织自发荧光淬灭剂的孵育时间，可在第一个样本添加 Tissue Autofluorescence Quencher 后开始计时 5 min；3.Tissue Autofluorescence Quencher 易挥发，在孵育过程中，需要及时补添，以免试剂变干凝固结块，影响后续拍照观察。

(8) 对于细胞爬片，可在载玻片上滴加水性封固剂或抗荧光淬灭剂，盖上贴有细胞的盖玻片封片，对于石蜡切片和冰冻切片等样本，可滴加水性封固剂或抗荧光淬灭剂于组织切片上，封住盖玻片封片，用荧光显微镜进行观察。对于孔板、培养皿内细胞样本，

加入适量 PBS 浸没细胞，再进行荧光显微镜拍照观察。绿色通道 (Ex/Em=490 nm/520 nm)。

显微镜拍照技巧：

- 1) 使用 DAPI 通道查找细胞位置；
- 2) 阴性对照组优先拍照，阴性对照显示荧光为非特异性染色荧光，需要通过黑白平衡进行扣除至无荧光；
- 3) 实验组或阳性组拍照，扣除与对照相同的黑白平衡，得到实验组或阳性组有效荧光。

2. 流式细胞仪分析

- (1) 将细胞重悬于 100 μ L 1×Equilibration Buffer 中，在室温下避光孵育 10 min。
- (2) 300 g 离心细胞，除去上清液，重悬于 50 μ L TdT 标记反应缓冲液中，在 37℃ 下孵育 1-2 h (不同的样本，可视情况调整孵育时间)，孵育期间可定时轻轻地晃动以混匀细胞。
- (3) 300 g 离心细胞。除去上清液，重悬于 1 mL PBS 中。重复洗涤 2 次。
- (4) 重悬于 200 μ L 1×DAPI 中，孵育 10 min。
- (5) 通过流式细胞仪分析细胞。

06 结果示例

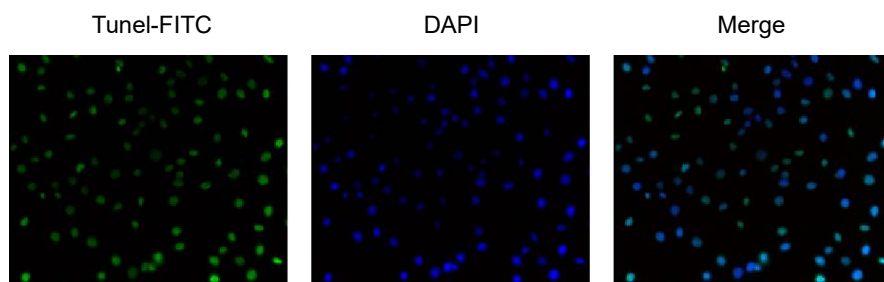


Figure 1.Hela 细胞用本试剂盒诱导剂诱导经一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）染色后检测的凋亡效果图。

07 FAQ

1. 做 TUNEL 凋亡检测，需要抗原修复或者冰冻修复吗？

需要先固定细胞，不需要做抗原修复，本试剂盒标记的是细胞核内的断裂基因，而不是抗原蛋白。

2. TUNEL 检测可以和免疫荧光 (IF) 一起双染吗？先后顺序在怎样的？

可以和 IF 进行共染，建议先做 TUNEL 检测，再做 IF。

3. 本品是否可以替代吖啶橙染色试剂盒？

可以，吖啶橙染色试剂盒组分存在致癌性，所以用 TUNEL 试剂盒进行凋亡检测安全性更高。

4. 组织样本无阳信号？

- (1) 提高蛋白酶 K 的工作浓度；
- (2) 在进行 TUNEL 分析时（即染色孵育之前），用 1x 的 Equilibration Buffer 平衡处理一遍，再加染色工作液；
- (3) 实验过程中注意别干片，干片会增加背景信号。

5. 实验过程 PBS 清洗步骤，需要在摇床上完成还是静止浸泡在 PBS 中？

均可，摇床清洗时要设置低转速，轻柔。

6. 实验过程中注意哪些步骤可以减轻组织的非特异荧光？

- (1) 可以用组织自发荧光淬灭剂，先拍阴性组扣除非特异性荧光；
- (2) 使用酸性或碱性固定液，导致 DNA 损伤，造成假阳性。建议使用 pH 中性的固定液固定组织或者细胞；
- (3) 固定液浓度过高/时间长，导致细胞自溶、DNA 链不规则断裂、造成假阳性。建议使用 4%多聚甲醛溶液；
- (4) 蛋白酶 K 处理时间过长/过大，破坏核酸结构，出现假阳性，可以摸一下浓度和时间；
- (5) TUNEL 染色时间过长，可减少孵育时间；
- (6) 未充分清洗样本，染色后 PBS 清洗次数可增加至 5 次，来避免切片的非特异性染色。

7. 脱蜡干净的状态是什么样的呢？

组织透明，玻片不挂水即为脱蜡干净。

8. 组织切片封片可以使用中性树脂吗？

不能用中性树脂，因为切片染色完毕后，处于水溶性状态，要用水溶性的封片剂，中性树脂是非水溶性封片剂，封片了之后会糊成一团，片子被破坏，用抗荧光淬灭封片剂来封片即可。

9. 冰冻切片的厚度推荐多少呢？

一般冰冻切片的厚度是在 8-10 μm。

08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA0002	Annexin V-AbFluor™ 488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒
KTA2011	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）
KTA4001	线粒体膜电位分析试剂盒（JC-1 法）
KTA3020	Caspase-1 活性分析试剂盒（比色法）
KTA3022	Caspase-3 活性分析试剂盒（比色法）
BMU104	SuperKine™ 增强型抗荧光淬灭剂

一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

(Abbkine 货号：KTA2010)



阳性对照：10 U/mL的DNase I (in 1 $\times$ DNase I Buffer) 消化10-20 min，PBS洗3次。
1 $\times$ Equilibration Buffer 孵育5 min

TUNEL 分析

工作液配置（各组分平衡至室温）：

去离子水	33 μ L
Equilibration Buffer (5 $\times$)	10 μ L
Working Label Mix Green	5 μ L
TdT Enzyme	2 μ L
总体积	50 μ L

加入工作液，37 $^{\circ}$ C
避光孵育1-2 h
PBS洗3次

试剂名称	试剂准备
1 $\times$ DNase I Buffer	用去离子水稀释10倍。
Working Label Mix Green	用Probe Diluent稀释25倍。
DAPI (1X)	使用PBS稀释500倍。

