Click EdUTP TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

货号: KTA2012　　规格：20 T/50 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=495 nm/519 nm
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

Click EdUTP TUNEL 检测方法是一种在常规 TUNEL（脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法）基本原理的基础上，通过对核苷酸类似物 EdUTP 进行改良，从而显著提升灵敏度的技术。其基本原理源于经典的 TUNEL 检测方法。在细胞凋亡过程中，染色体 DNA 会发生双链或单链断裂，产生大量带有粘性末端的 3'-羟基（3'-OH）。在脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT）的催化下，可对游离的 3'-OH 末端进行标记。传统的 TUNEL 技术通常采用荧光素或生物素直接修饰的脱氧尿苷三磷酸核苷酸（dUTP），通过 TdT 酶一步法将其掺入 DNA 断裂位点，从而实现对凋亡细胞的染色。由于正常或正在增殖的细胞缺乏 DNA 断裂和 3'-OH 形成，因此很少被染色，这使得 TUNEL 技术成为了检测细胞凋亡的经典方法。

Click EdUTP TUNEL 技术在传统方法的基础上进行了优化，其核心在于应用了一种改良的核苷酸类似物 EdUTP。该类似物在 dUTP 分子上连接了一个体积微小的生物正交炔基修饰基团。在检测过程中，由于炔基的分子尺寸远小于传统 TUNEL 所使用的荧光素或其他大分子修饰的基团，TdT 酶能够更有效地识别并催化 EdUTP 掺入到 DNA 断裂后产生的 3'-羟基末端。这种高效掺入使得断裂位点能够被更充分地标记，从源头上提升了检测的潜在灵敏度。随后的信号放大与检测步骤依赖于点击化学反应原理。在铜离子催化下，已掺入到 DNA 断裂处的炔基能够与后续加入的荧光标记叠氮化物发生高效、特异性的共价结合，形成一个稳定的三唑环结构。这一反应具有快速、高效、生物相容性好的特点，确保了检测信号的精确和稳定。

Click EdUTP TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）基于上述原理，提供了从标记到检测的全套试剂组分以及优化的实验方案。其适用于多种样品类型，包括贴壁细胞、悬浮细胞、石蜡包埋组织切片和冰冻切片，并兼容荧光显微镜观察与流式细胞仪分析两种检测平台。荧光信号检测通道为绿色通道（Ex/Em=495 nm/519 nm）。

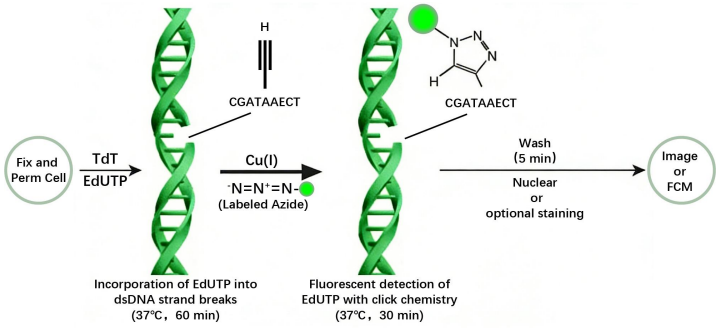


Figure 1. Click EdUTP TUNEL 实验原理图

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	20 T	50 T	
BSA Wash Solution(5×)	6 mL	15 mL	-20℃
TritonX-100(100%)	100 μL	100 μL	4℃
DNase I(5 U/μL)	4 μL	10 μL	-20℃
10×DNase I Buffer	0.3 mL	0.6 mL	-20℃
TdT Enzyme	40 μL	100 μL	-20℃
Equilibration Buffer	2 mL	5 mL	-20℃
EdUTP	10 μL	25 μL	-20℃，避光保存
Probe Diluent	100 μL	250 μL	-20℃
Reaction buffer(10×)	100 μL	300 μL	4℃
AbFluor 488 azide	8 μL	20 μL	-20℃，避光保存
Copper Reagent	30 μL	75 μL	4℃
Copper Protectant	70 μL	175 μL	-20℃，避光保存
Reducing Agent	100 mg	100 mg×2	-20℃，避光保存
DAPI(500×)	5 μL	12 μL	-20℃，避光保存
Tissue Autofluorescence Quencher	2 mL	5 mL	常温，避光保存，组织样本检测使用
Proteinase K(20mg/mL)	4 μL	10 μL	-20℃

注：本试剂盒 20 T/50 T 规格用于荧光显微镜时，以 96 孔板为例，每孔 50 μL 体系，可以分别进行 20 次和 50 次检测；以 24 孔板为例，每孔 200 μL 体系，可以分别进行 5 次和 10 次检测，以此类推。用于流式细胞仪时，每个样本 200 μL 体系，可以分别进行 5 次和 10 次检测。

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	流式细胞仪检测通道为 FITC 通道
耗材	细胞培养板	普通细胞培养板
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）、4%多聚甲醛（固定液）、去离子水、二甲苯、乙醇、组化笔及抗荧光淬灭剂	/
其他	离心机、可调节式移液枪及枪头	/

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
TritonX-100 (0.3%)	用 PBS 将 100% TritonX-100 稀释成 0.3% TritonX-100。	根据实际用量。
TritonX-100 (0.2%)	用 PBS 将 100% TritonX-100 稀释成 0.2% TritonX-100。	根据实际用量，流式细胞仪检测用。
1×DNase I Buffer	用去离子水将 10×DNase I Buffer 稀释成 1×DNase I Buffer。	根据实际用量。
Equilibration Buffer	使用前 800 g 离心 5 min，弃沉淀，取上清。	根据实际用量，流式细胞仪检测用。
EdUTP Working Solution	用 Probe Diluent 将 EdUTP 稀释 10 倍得到 EdUTP Working Solution。	根据实际用量，未用完的 EdUTP 于-20℃避光分装保存 12 个月，避免反复冻融。
BSA Wash Solution (1×)	向 BSA Wash Solution（5×）中添加磷酸盐缓冲液（PBS），将 5×母液稀释成 1×工作液（终浓度为 3% BSA），并混匀。	使用后分装并保存在-20℃, 该溶液可稳定保存 6 个月。
Reaction Buffer (1×)	使用前, 平衡到室温, 使用去离子水 10 倍稀释 Reaction Buffer (10×)至 Reaction Buffer (1×)。	4℃保存。
Reducing Agent （10×）配制	向 Reducing Agent 中添加 1 mL 去离子水配制终浓度为 100 mg/mL 的 Reducing Agent（10×）并混合直至化合物完全溶解。	使用后分装-20℃保存, 可稳定保存 6 个月，冻存溶解后若有白色物质析出，请吹打混匀确保完全溶解后再使用。若溶液变成棕色，说明组分已经降解，不建议继续使用。
DAPI (1×)	用 PBS 将 DAPI (500×)稀释成 DAPI(1×)。	根据实际用量。
Tissue Autofluorescence Quencher	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，必要时可在盖紧后缠包封口膜。

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) 将细胞接种于 96 孔板等多孔板、细胞培养皿或者细胞爬片上，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃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。以下操作以 96 孔板为例。

(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 0.3% Triton X-100，用 50 μL BSA Working Solution 封闭细胞 2-3 次，每次 5 min。用 200 μL PBS 清洗 2-3 次。

注意：

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 0.3% Triton X-100 体积，浸没细胞即可。

(6) 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 10-20 min 后，样本用 200 μL PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，然后继续进行步骤 **05-2-2** 的

荧光显微镜分析。

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，台盼蓝计数后细胞活率在 95%以上。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 5 min 并收集细胞（一个样本细胞密度约 5×10^6 个细胞），用 PBS 洗涤 1 次。

注意：

1) 贴壁细胞使用胰酶（不含 EDTA）消化后离心收集细胞，如果消化时间过长，易造成细胞膜结构损伤而出现细胞坏死的假阳性，所以需控制胰酶消化时间（推荐使用温和消化液消化）。

2) 若清洗步骤易造成细胞流失，可跳过清洗，直接进入后续固定操作，减少细胞损耗。

(3) 每 5×10^6 个细胞加入 1 mL 4%多聚甲醛，在室温下孵育 30 min，其间可轻轻晃动摇匀细胞，以确保样本得到充分固定。

(4) 以 800 g 离心细胞 5 min，除去固定液，重悬于 1 mL PBS 中，重复洗涤 2 次。

(5) 以 800 g 离心细胞 5 min，除去上清液，每 5×10^6 个细胞加入 500 μL 0.2% Triton-X 100，4℃通透 10 min。

(6) 以 800 g 离心细胞 5 min，除去上清液，重悬于 1 mL PBS 中。重复洗涤 2 次。

(7) 以 800 g 离心细胞 5 min，除去上清液，用 500 μL BSA Working Solution 封闭细胞 15 min，封闭期间可轻轻晃动摇匀细胞。

(8) 以 800 g 离心细胞 5 min，除去封闭液，用 1 mL PBS 清洗 2 次。

(9) 阳性对照的设置，样本制备完成后，在室温条件下可用 1 mL 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 10-20 min 后，样本用 PBS 洗涤 2-3 次，然后继续进行步骤 **05-2-2** 的流式细胞仪分析。

注意：DNase I 诱导效率受诱导时间、孵育温度及细胞密度影响，建议 DNase I 初始浓度为 10 U/mL，孵育时间为 10 min，若出现诱导不充分或诱导过度导致细胞丢失等现象，可以适当调整 DNase I 浓度和孵育时间，以确定能在“产生最大阳性信号”与“维持最少细胞物理性丢失”之间取得平衡的最佳条件。

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 5 min，然后依次在 95%，70%和 50%乙醇中洗涤 1 次，每次 3 min。

(3) 用适量的 PBS 浸洗样品 2 次，每次 5 min。

(4) 排出切片表面多余的 PBS，使用组化笔在组织周围画圈。滴加 50-200 μL 4%多聚甲醛固定液，37℃固定 15 min。

(5) 使用去离子水冲洗玻片，用适量的 PBS 浸洗样品 5 min。排出切片表面多余的 PBS，滴加 50-200 μL 20 μg/mL 蛋白酶 K（由 PBS pH7.4 配制，现配现用）溶液室温孵育 8-10 min。

(6) 用适量的 PBS 浸洗样品 1 次，5 min。排出切片表面多余的 PBS，滴加 50-200 μL 4%多聚甲醛固定液，37℃固定 15 min。

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。

(7) 使用去离子水冲洗玻片，用适量的 PBS 浸洗样品 5 min。

(8) 阳性对照的设置，样本制备完成后，在室温条件下可用 1 mL 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）消化组织 10-20 min 后，样本用 PBS 浸洗 5 min；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。然后继续进行步骤 **05-2-2** 的荧光显微镜分析。

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) 排出切片表面多余的 PBS，使用组化笔在组织周围画圈。滴加 50-200 μL 20 μg/mL 蛋白酶 K（在 PBS pH7.4 中，现配现用）溶液室温孵育 8-10 min。

(4) 用适量的 PBS 浸洗样品 3 次，每次 5 min 来终止蛋白酶消化作用。

(5) 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）消化组织 10-20 min 后，样本用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；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。然后继续进行步骤 **05-2-2** 的荧光显微镜分析。

05-2-2 EdUTP 标记

根据要分析的样品数量，在使用前准备 EdUTP 标记反应缓冲液（表中为 1 个反应体系，以供参考）：

反应组分	96 孔板每孔体积（μL）	24 孔板每孔体积（μL）
Equilibration Buffer	45	180
EdUTP Working Solution	5	20
TdT Enzyme	2	8
总体积	52	208

注意：配制 EdUTP 标记反应缓冲液之前，将各组分平衡至室温，Equilibration Buffer 因低温保存，会出现少量成分析出的现象，请颠倒混匀充分溶解后使用。Equilibration Buffer 中含有高毒性化学物质二甲胂酸钠和氯化钴，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。

1. 荧光显微镜分析

(1) 向每个样品中加入 50 μL（96 孔板推荐 50 μL，48 孔板推荐 140 μL，24 孔板推荐 200 μL，12 孔板推荐 400 μL，6 孔板推荐 1 mL，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）Equilibration Buffer，室温避光孵育 5 min。

(2) 除去 Equilibration Buffer，向每个样品中加入 50 μL（96 孔板推荐 50 μL，48 孔板推荐 140 μL，24 孔板推荐 200 μL，12 孔板推荐 400 μL，6 孔板推荐 1 mL，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）EdUTP 标记反应缓冲液，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，从而尽量减少反应缓冲液的蒸发。

(3) 去除反应缓冲液，用 200 μL BSA Wash Solution 将样品浸洗 3 次，每次 5 min。

(4) 转步骤 **05-2-3**。

2. 流式细胞仪分析

(1) 取 1×10^6 个细胞重悬于 200 μL Equilibration Buffer 中，在室温下避光孵育 5 min。

(2) 以 800 g 离心细胞 5 min，除去上清液，重悬于 200 μL EdUTP 标记反应缓冲液中，在 37℃下避光孵育 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) 以 800 g 离心细胞 5 min，除去上清液，重悬于 1 mL BSA Wash Solution 中。重复洗涤 2-3 次。

(4) 转步骤 **05-2-3**。

05-2-3 EdUTP 检测

根据下表制备 Click-iT 工作液;

注意：

(1) 要按表中列出的顺序添加成分，每加入一种试剂务必保证充分混匀后再加入下一种，否则反应将无法得到最佳效果。配置好的 Click-iT 工作液必须在 15 min 内使用。

(2) 在该步骤中，每个样品中加入 50 μL（96 孔板推荐 50 μL，48 孔板推荐 140 μL，24 孔板推荐 200 μL，12 孔板推荐 400 μL，6 孔板推荐 1 mL，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）Click-iT 工作液。Click-iT 工作液体积可根据实际情况进行调节，但必须按比例加入反应组分。

组分	1 个样本	5 个样本	10 个样本
Copper Reagent	1 μL	5 μL	10 μL
Copper Protectant	3 μL	15 μL	30 μL
Reaction Buffer(1×)	40.6 μL	203 μL	406 μL
AbFluor 488 Azide	0.4 μL	2 μL	4 μL
Reducing Agent(10×)	5 μL	25 μL	50 μL
Total Volume	50 μL	250 μL	500 μL

1. 荧光显微镜分析

(1) 除去 BSA Wash Solution，向每个样品中加入 50 μL（96 孔板推荐 50 μL，48 孔板推荐 140 μL，24 孔板推荐 200 μL，12 孔板推荐 400 μL，6 孔板推荐 1 mL，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）Click-iT 工作液，并在湿盒中 37℃下避光孵育 30 min。

(2) 除去 Click-iT 工作液，用 BSA Wash Solution (1×)浸洗孔中细胞 3-5 min，重复 3 次。除去 BSA Wash Solution (1×)，加入适量 PBS 浸没细胞，进行荧光显微镜拍照观察，绿色通道（Ex/Em=495 nm/519 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) 以 800 g 离心细胞 5 min，除去 BSA Wash Solution，向每个样品中加入 200 μL Click-iT 工作液，37℃避光孵育 30 min。

(2) 以 800 g 离心细胞 5 min，除去 Click-iT 工作液，用 BSA Wash Solution 浸洗细胞 3-5 min，重复 2-3 次。

(3) 若无需染核可 800 g 离心细胞 5 min, 除去 BSA Wash Solution, PBS 重悬后上流式细胞仪检测。绿色通道（Ex/Em=495 nm/519 nm），DAPI 通道（Ex/Em=360 nm/460 nm）。

05-2-4 可选步骤：进行 DAPI 核染色或抗体标记

1. 细胞核染色

(1) 接步骤 05-2-3，除去 BSA Wash Solution，使用 DAPI (1×)室温避光染色 10 min。

重要提示：在孵育过程中一定要避光。

(2) 除去 DAPI (1×)染色液，PBS 浸洗样品 3 次，每次 5 min。

(3) 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：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，也会一定程度降低 Click EdUTP TUNEL 的荧光强度，但不影响荧光显微镜拍照。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。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。

(4) 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。非贴壁细胞可在 PBS 中重悬后，直接上流式细胞仪检测。绿色通道（Ex/Em=495 nm/519 nm），DAPI 通道（Ex/Em=360 nm/460 nm）。

2. 抗体标记

(1) 接步骤 **05-2-3**，除去 BSA Wash Solution，参考抗体说明书，按比例稀释一抗，立即加入稀释好的一抗，室温在侧摆摇床上缓慢摇动孵育 1 h 或 4℃缓慢摇动孵育过夜。

(2) 回收一抗。加入适量 PBS，在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤 5 min，重复洗涤 3 次。如果结果背景较高可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数。

(3) 参考抗体说明书，按比例稀释二抗，立即加入稀释好的二抗，室温在侧摆摇床上缓慢摇动避光孵育 1 h。

(4) 回收二抗。加入适量 PBS，在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤 5 min，重复洗涤 3 次。如果结果背景较高可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数。

(5) 使用 DAPI (1×)室温避光染色 10 min。

重要提示：在孵育过程中一定要避光。

(6) 除去 DAPI (1×)染色液，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：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，也会一定程度降低 Click EdUTP TUNEL 的荧光强度，但不影响荧光显微镜拍照。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。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=495 nm/519 nm），DAPI 通道（Ex/Em=360 nm/460 nm）。

06 结果示例

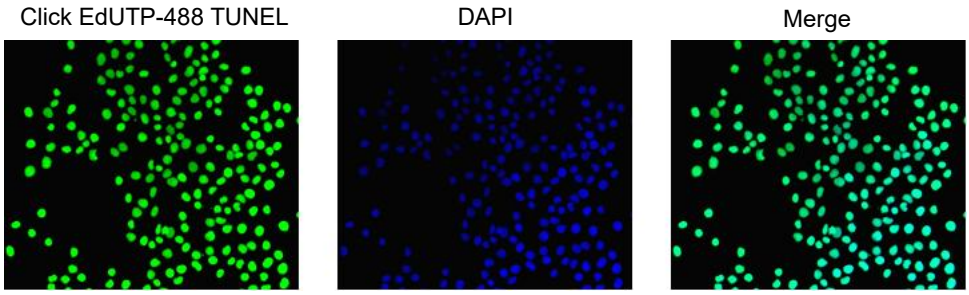


Figure 2.Hela 细胞用本试剂盒诱导剂诱导经 Click EdUTP TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）染色后检测的凋亡效果图。

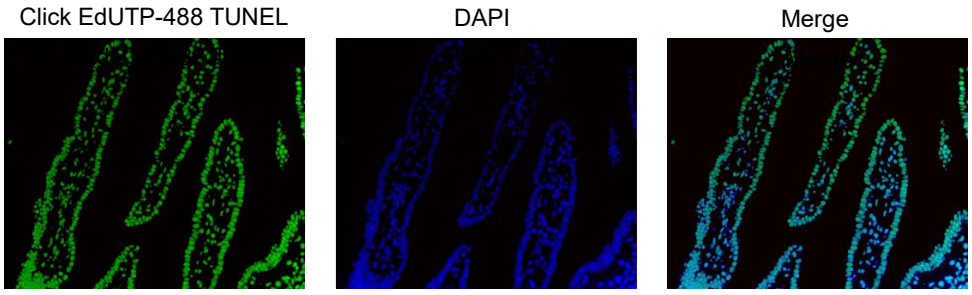


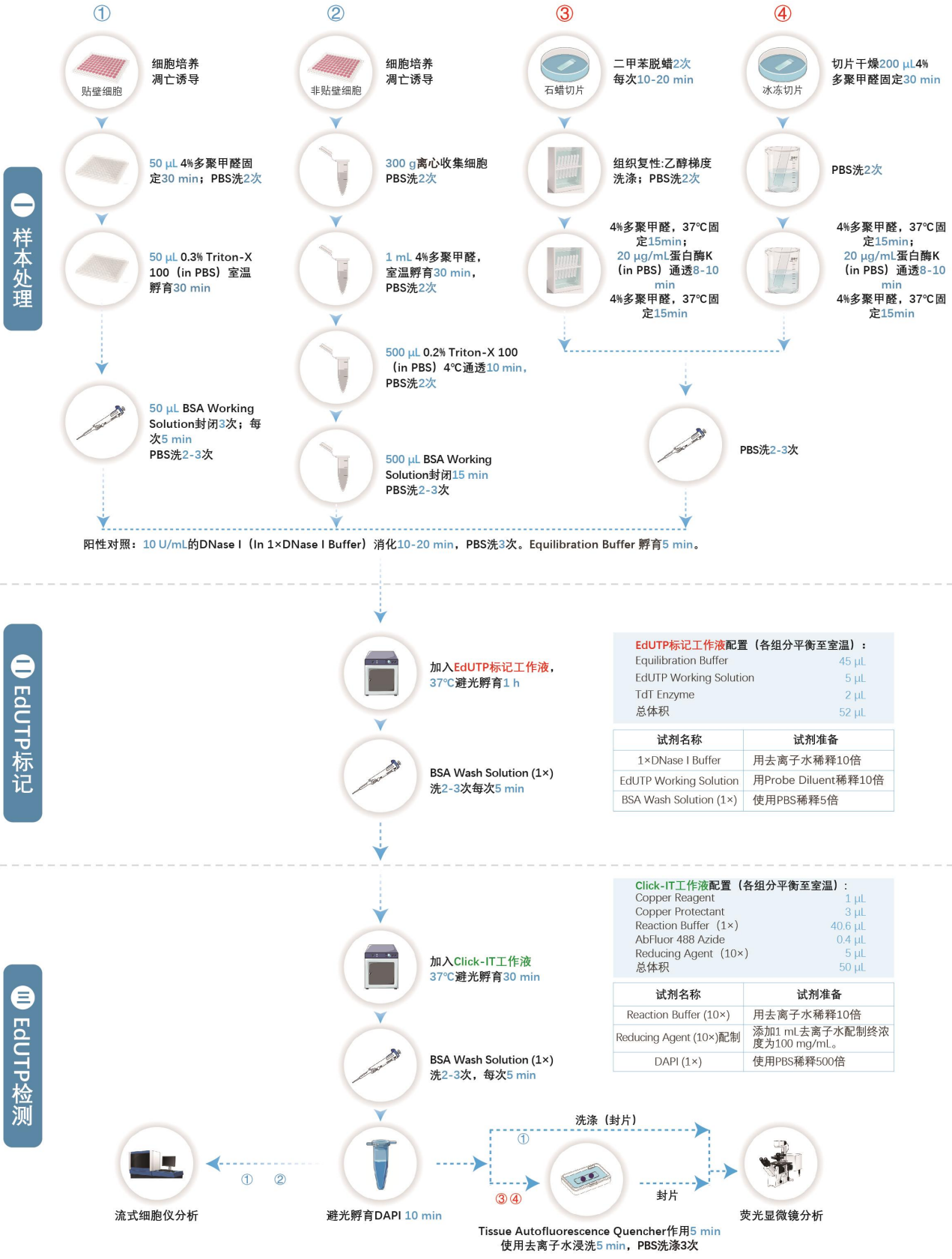
Figure 3.小鼠肠道组织切片用本试剂盒诱导剂诱导经 Click EdUTP TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）染色后检测的凋亡效果图。

07 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
KTA2010	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）
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）
KTA2013	Click EdUTP TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）
BMU104	SuperKine™ 增强型抗荧光淬灭剂

Click EdUTP TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

（Abbkine 货号：KTA2012）



V1.0