

## 一步法 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒（红色，FineTest®647）

### One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit (Red, FineTest®647)

货号：FNCK103

规格：20 Assays / 50 Assays / 100 Assays

保存条件：-20℃可保存一年。Labeling Solution 和 DAPI Reagent (25 μg/mL) 需避光保存。

Cat.	products	20 Assays	50 Assays	100 Assays	Storage
FNCK10A	TdT Equilibration Buffer	4 mL	9 mL	9 mL×2	-20℃
FNCK10B	TdT Enzyme	100 μL	250 μL	250 μL×2	-20℃
FNCK10C	Proteinase K (100×)	20 μL	50 μL	100 μL	-20℃
FNCK103D	Labeling Solution(FineTest® 647)	100 μL×2	100 μL×5	100 μL×10	-20℃
FNCK10E	DNase I (20 U/μL)	5 μL	13 μL	25 μL	-20℃
FNCK10F	DNase I Buffer (10×)	300 μL	700 μL	1500 μL	-20℃
FNCK10G	DAPI Reagent(25 μg/mL)	100 μL	250 μL	500 μL	-20℃

\*Labeling Solution 每个货号对应的荧光素不同。

### 产品简介

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒是一种高灵敏度且快速简便的细胞凋亡检测方法。检测结果可通过荧光显微镜直接观察。

本试剂盒适用于组织样本和细胞样本的原位凋亡检测，样本类型包括细胞爬片/涂片，石蜡切片和冰冻切片。

### 检测原理

细胞在发生凋亡时，会激活一些 DNA 内切酶，剪断核小体间的基因组 DNA，暴露的 3'-OH，可在末端脱氧核酸转移酶的催化下加上荧光素标记的 dUTP，即可通过荧光显微镜直接观察。

### 自备试剂

#### 1、细胞样本

固定液(4%多聚甲醛溶于 PBS)。

通透液(0.2%的 Triton-100 溶于 PBS)。

#### 2、石蜡切片

二甲苯、乙醇。

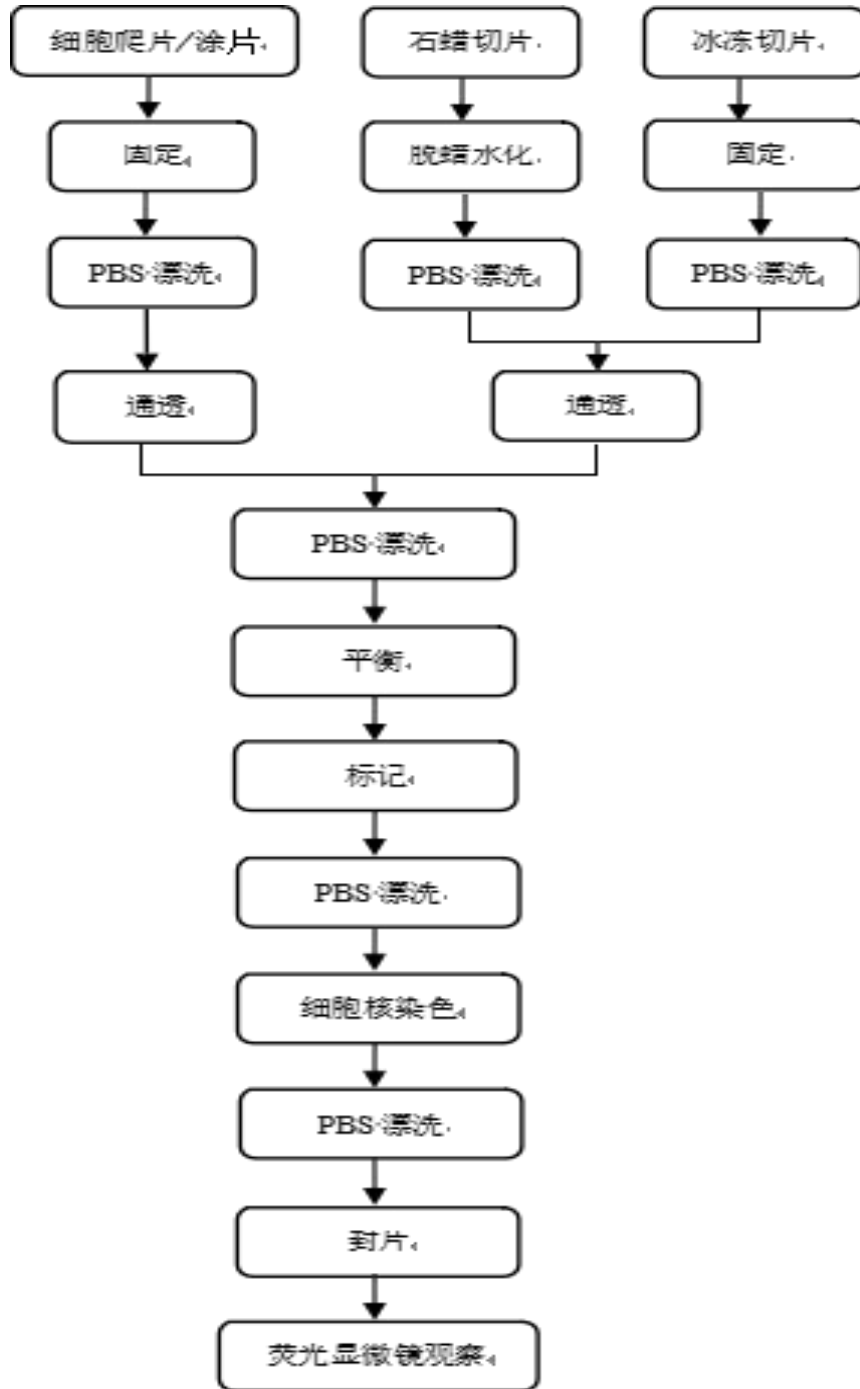
#### 3、冰冻切片

固定液(4%多聚甲醛溶于 PBS)。

#### 4、其他试剂

PBS、ddH<sub>2</sub>O、抗荧光淬灭剂的封片液。

#### 实验流程



#### 实验操作指南

#### 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。现配现用。
- 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。现配现用。  
**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。现配现用。

## 固定和通透

### 样本处理

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。  
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。
  - 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°C 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 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。
  - 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 μL 1×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 μL 1×蛋白酶 K 工作液，37°C 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。**
  - 4) 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

#### 阳性对照

- 1) 滴加 100 μL 1×DNase I Buffer 工作液到已通透的样本上，室温平衡 5 min。
- 2) 用吸水纸去除样本上多余的液体。加入 100 μL 稀释后的 DNase I 工作液 (200 U/mL)，37°C 孵育 10~30 min。

- 3) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。

阴性对照

- 1) 滴加 100  $\mu\text{L}$  1 $\times$ DNase I Buffer 工作液到已通透的样本上, 室温平衡 5 min。
- 2) DNase I Buffer 孵育阴性样本, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 10~30 min。
- 3) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。

实验组

- 1) 实验组通透完成后在 PBS 中静置, 等待阳性对照和阴性对照处理后共同进行标记染色。

## 2. 标记工作液的配制

计算好样本量集中配制, 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/实验组	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:

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 $^{\circ}\text{C}$ , 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  $\mu\text{L}$  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。

## 3. 标记步骤

- 1) 每个样本滴加 100  $\mu\text{L}$  TdT Equilibration Buffer, 37 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  标记工作液, 放入湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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)	Filter Set
FNCK100	FITC	490/520	FITC Filter Set
FNCK101	Labeling Solution(FineTest® 488)	495/519	FITC Filter Set
FNCK102	Labeling Solution(FineTest® 594)	590/617	TRITC Filter Set
FNCK103	Labeling Solution(FineTest® 647)	650/665	Cy5 Filter Set
FNCK104	Labeling Solution(FineTest® 555)	555/565	TRITC 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。

### 注意事项

1. PBS 清洗样本后，请尽量除去 PBS 溶液后再进行下一步操作。
2. 实验过程中请保持样本的湿润，防止干片造成的实验失败。
3. TdT酶工作液现配现用，短暂于冰上保存，长期保存会导致酶失活影响实验结果。
4. 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。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
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。