

## Product Data Sheet

Product Name: One-step TUNEL Apoptosis Detection Kit (Green, FITC)  
Cat. No.: GK10040

### Components

Component	20 rxns	50 rxns	100 rxns
5 × Equilibration Buffer	1 mL	2 × 1 mL	4 × 1 mL
FITC-12-dUTP Mix	100 µL	250 µL	2 × 250 µL
TdT Enzyme	20 µL	50 µL	2 × 50 µL
Proteinase K (2 mg/mL)	40 µL	100 µL	2 × 100 µL
DNase I (2 U/µL)	5 µL	13 µL	2 × 13 µL
10 × DNase I Buffer	100 µL	260 µL	2 × 260 µL

### Features

Applications	灵敏度高：能够清晰区分凋亡细胞与非凋亡细胞。 操作简单：一步法标记，节省时间和精力。 适用广泛：冷冻或石蜡切片样品的细胞凋亡检测；培养的贴壁细胞的凋亡检测。 可靠性强：提供阳性对照试剂，确保结果准确。
Shipping	蓝冰运输
Storage	-20°C储存, 避光保存1年。
Usage	For Research Use Only! Not For Use in Humans.

### Protocol

#### I 需自备试剂：

##### 1. 细胞样本和冰冻切片：

新鲜制备的4%多聚甲醛（PBS配置），0.2% Triton X-100（PBS配置）。

可提前1-2天配置，0.22µm过滤灭菌后，4℃储存备用。

##### 2. 石蜡切片：

二甲苯、无水乙醇。

##### 3. 其他试剂：

PBS, ddH<sub>2</sub>O, Antifade Mounting Medium with DAPI (Cat.No. GC26283)

#### II 实验流程

##### 1. 细胞爬片样本

###### 1.1. 样本预处理

1.1.1. 在所需合适大小的孔板中，用TC处理的细胞爬片上培养贴壁细胞。在凋亡诱导处理之后，用PBS漂洗载玻片2次。

1.1.2. 加入过量的4%多聚甲醛，完全浸没爬片，在4℃放置25min，进行细胞固定。

**Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.**

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

## Product Data Sheet

1.1.3.用 PBS 溶液中清洗2-3次，每次室温放置5min。

1.1.4. 加入过量的0.2% Triton X-100，室温通透5min。

*注意: 优先推荐使用Triton X-100进行通透。也可使用 Proteinase K 进行通透按1:100的比例，用PBS 稀释浓度为2mg/mL的Proteinase K溶液，使其终浓度为20µg/mL。在每个样本上滴加100µL 稀释好的Proteinase K溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育5min（孵育时间需摸索）。通透时间最长不要超过15min。*

1.1.5. 用 PBS 溶液中清洗2-3次，每次室温放置 5min。

1.2. (可选步骤) 阳性对照

1.2.1. 准备湿盒，底部倒入一层水，平展的铺上一层洁净的保鲜膜。

1.2.2. 按 1:10 的比例用ddH<sub>2</sub>O将10×DNase I Buffer稀释成1×DNase I Buffer备用。

1.2.3. 滴加100µL 1×DNase I Buffer至湿盒内的保鲜膜上，将细胞爬片从孔板中取出，细胞面向下盖住1×DNase I Buffer，室温平衡5min。

1.2.4. 用1×DNase I Buffer稀释DNase I(2000U/mL)，使其终浓度为20U/mL。

1.2.5. 将50µL 20U/mL DNase I滴加至湿盒内的保鲜膜上。

1.2.6. 将细胞爬片取出，轻轻吸干多余水分，细胞面向下盖住20U/mL DNase I，37°C孵育10min。

1.2.7. 将细胞爬片取出，有细胞的一面向上放入洁净的孔板中，用过量PBS清洗3次，每次5min。

*注意: 阳性对照必须使用单独的染色缸或孔板。阳性对照上残余的DNase I可能会在实验组中造成假阳性的错误信号。*

1.3. 标记及检测

1.3.1. 准备避光湿盒，底部倒入一层水，平展的铺上一层洁净的保鲜膜。

1.3.2. 按 1:5 的比例用 ddH<sub>2</sub>O 将5×Equilibration Buffer 稀释成1×Equilibration Buffer。

1.3.3. 滴加100µL 1×Equilibration Buffer至湿盒内的保鲜膜上，将细胞爬片从孔板中取出，细胞面向下盖住1×Equilibration Buffer，室温平衡 5-10min。

1.3.4. 平衡期间，在冰浴和避光条件下按照下表配置标记液。

组分	阴性对照	阳性对照+样品
ddH <sub>2</sub> O	35µL	34µL
5×Equilibration Buffer	10µL	10µL
FITC-12-dUTP Mix	5µL	5µL
TdT Enzyme	0	1µL

1.3.5.平衡结束后，将标记液50µL滴到洁净的保鲜膜上，取出爬片，用吸水纸吸干多余液体，盖住相应的标记液，注意避光。

*注意: 标记液体积: 对于面积小于5cm<sup>2</sup>的反应，所需体积是50µL，用50µL乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需TdT标记反应液的总体积。对于表面积更大的样本，可成比例地增加试剂体积。*

1.3.6盖紧湿盒的盖子，注意避光，防止爬片干燥，37 °C 孵育60min。

**Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.**

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

## Product Data Sheet

---

1.3.7取出爬片，轻轻去掉多余液体，放入新的孔板中，用新鲜的PBS 溶液清洗2次，每次5min。

*注意:如果背景过高，为了降低背景，样本在用PBS清洗后，可再用含0.1% Triton X-100和5mg/mL BSA的PBS洗3次，每次5min，这样可将游离的未反应标记物清除干净。*

1.3.8载玻片上滴加1滴Antifade Mounting Medium with DAPI (Cat.No. GC26283)

1.3.9取出爬片，用吸水纸轻轻吸掉周围的溶液，盖住载玻片的Antifade Mounting Medium with DAPI，并进行封片。

1.3.10立即在荧光显微镜下分析样本，在激发/发射波长 492/517nm下观察绿色荧光;或在激发/发射波长 356/451nm下观察 DAPI的蓝色荧光。

### 2.细胞涂片样本

#### 2.1. 样本预处理

2.1.1. 细胞涂片:以 $2 \times 10^6$  cells/mL的浓度将细胞重悬于PBS。吸取50-100 $\mu$ L细胞悬液涂片在多聚赖氨酸包被的载玻片上，晾干。进入后续实验。

2.1.2. 将涂片浸入装有4%多聚甲醛的染色缸中，在4 $^{\circ}$ C 放置25min进行细胞固定。

2.1.3.用 PBS 溶液清洗2-3次，每次室温放置 5min。

2.1.4. 将涂片浸没于0.2% Triton X-100溶液中，室温通透5min。

*注意:优先推荐使用 Triton X-100进行通透。也可使用 Proteinase K 进行通透，按1:100 的比例，用PBS 稀释浓度为2mg/mL的Proteinase K溶液，使其终浓度为20 $\mu$ g/mL。在每个样本上滴加100 $\mu$ L 稀释好的Proteinase K溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育5min（孵育时间需摸索）。*

2.1.5. 用 PBS 溶液清洗2-3次，每次室温放置5min。

2.1.6. 轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持湿润。

#### 2.2. (可选步骤) 阳性对照

2.2.1. 准备避光湿盒，底部放入用水浸湿的纸巾，载玻片全部转移到湿盒中。

2.2.2. 按 1:10 的比例用 ddH<sub>2</sub>O 将10 $\times$ DNase I Buffer 稀释成1 $\times$ DNase I Buffer备用。

2.2.3. 滴加 100 $\mu$ L 1 $\times$ DNase I Buffer 至已通透的样本上，室温平衡 5min。

2.2.4. 用 1 $\times$ DNase I Buffer 稀释 DNase I(2000U/mL)，使其终浓度为20U/mL。

2.2.5. 轻轻吸干载玻片上的多余液体，每个阳性对照样品滴加100 $\mu$ L 20U/mL DNase I溶液。

2.2.6. 37 $^{\circ}$ C 孵育10min。

2.2.7. 轻轻吸干载玻片上的多余液体，用PBS清洗3次，每次5min。

*注意:阳性对照载玻片必须使用单独的染色缸。阳性对照载玻片上残余的DNase I可能会在实验组中造成假阳性的错误信号。*

#### 2.3. 标记及检测

**Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.**

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

## Product Data Sheet

- 2.3.1. 底部放入用水浸湿的纸巾，载玻片全部转移到湿盒中。
- 2.3.2. 按 1:5 的比例用 ddH<sub>2</sub>O 将 5×Equilibration Buffer 稀释成 1×Equilibration Buffer。
- 2.3.3. 滴加 100μL 1×Equilibration Buffer 至湿盒内的样品上，室温平衡 5-10min。
- 2.3.4. 平衡期间，在冰浴和避光条件下按照下表配置标记液。

组分	阴性对照	阳性对照+样品
ddH <sub>2</sub> O	35μL	34μL
5×Equilibration Buffer	10μL	10μL
FITC-12-dUTP Mix	5μL	5μL
TdT Enzyme	0	1μL

2.3.5. 平衡结束后，用吸水纸吸干多余液体，在样本上滴加 50μL 标记液，注意避光。

*注意: 标记液体积: 对于面积小于 5cm<sup>2</sup> 的反应，所需体积是 50μL，用 50μL 乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需 TdT 标记反应液的总体积。对于表面积更大的样本，可成比例地增加试剂体积。*

2.3.6 盖紧湿盒的盖子，注意避光，防止样本干燥，37 °C 孵育 60min。

2.3.7 轻轻吸掉多余液体，用新鲜的 PBS 溶液清洗 2 次，每次 5min。

*注意: 如果背景过高，为了降低背景，样本在用 PBS 清洗后，可再用含 0.1% Triton X-100 和 5mg/ml BSA 的 PBS 洗 3 次，每次 5min，这样可将游离的未反应标记物清除干净。*

2.3.8 用吸水纸轻轻擦掉样本周围的液体，样本上滴加 1 滴 Antifade Mounting Medium with DAPI (Cat.No. GC26283)

2.3.9 用盖玻片盖住载玻片的 Antifade Mounting Medium with DAPI，进行封片。

2.3.10 立即在荧光显微镜下分析样本，在激发/发射波长 492/517nm 下观察绿色荧光；或在激发/发射波长 356/451nm 下观察 DAPI 的蓝色荧光。

### 3. 石蜡包埋组织切片样本

#### 3.1. 样本预处理

3.1.1. 室温下将切片浸入二甲苯脱蜡 2 次，每次 5-10min，以彻底脱掉石蜡。

*注意: 二甲苯有毒且易挥发，请在独立设置的实验室或者通风橱中进行。低温可能影响二甲苯脱蜡效果。当室温低于 20 时，可将脱蜡时间延长至 20min。*

3.1.2. 室温下将切片浸入无水乙醇浸泡润洗 2 次，每次 5min。

3.1.3. 室温下依次将切片浸入 90%、80%、70% 乙醇各 1 次，每次 3min。

3.1.4. 用 PBS 浸泡润洗切片，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围多余的液体。

3.1.5 按 1:100 的比例，用 PBS 稀释浓度为 2mg/mL 的 Proteinase K 溶液，使其终浓度为 20μg/mL。每个样本上滴加 100μL 稀释好的 Proteinase K 溶液，使溶液覆盖全部样本区域，37 °C 孵育 15-30 分钟(不同组织的最佳作用温度和时间需自行摸索)。

*注意: 不同组织或物种的样本反应时间可能不同。Proteinase K 通透时间过长可能会导致组织切片在后续步骤中从载玻*

**Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.**

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

## Product Data Sheet

片上脱落，过短造成通透处理不充分，影响标记效率。建议进行预实验，确定反应时间。

3.1.6. 用PBS 溶液中清洗2-3次，每次室温放置5min。

*注意: 这一步必须把Proteinase K清洗干净，否则会严重干扰后续的标记反应。*

3.2. 阳性对照（可选步骤）和3.3标记及检测参考细胞涂片样本2.2和2.3

### 4. 冰冻组织切片样本

#### 4.1. 样本预处理

4.1.1. 将冰冻切片置于长架上，室温晾干 20min。

4.1.2. 将载玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液中，室温固定 30min。。

4.1.3. 轻轻去掉多余液体，并用吸水纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。

4.1.4. 用PBS 浸泡润洗切片2次，每次5min。用滤纸小心吸干载玻片上样本周围多余的液体。

4.1.5每个样本上滴加 100μL 浓度为 0.2%的 Triton X-100 溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 15-30min。如果通透效果不好，按1:100 的比例，用 PBS 稀释浓度为2mg/mL的 Proteinase K 溶液，使其终浓度为20μg/mL。每个样本上滴加 100μL稀释好的Proteinase K溶液，使溶液覆盖全部样本区域，37 °C 孵育10-30min。

*注意: 不同组织或物种的样本反应时间可能不同。Proteinase K通透时间过长可能会导致组织切片在后续步骤中从载玻片上脱落，过短造成通透处理不充分，影响标记效率。建议进行预实验，确定反应时间。*

4.1.6. 用 PBS 溶液中清洗2-3次，每次室温放置5min。用滤纸吸干样本周围液体。

*注意: 这一步必须把Proteinase K清洗干净，否则会严重干扰后续的标记反应。*

4.2. 阳性对照（可选步骤）和4.3标记及检测参考细胞涂片样本2.2和2.3

### III 注意事项

1. 5×Equilibration Buffer中含有表面活性剂，所以在细胞涂片/切片样本的载玻片上滴加会扩散流失，建议实验开始前用PAP Pen圈出染色区域。

2. 5×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。使用前涡旋混匀。

3. FITC-12-dUTP Mix 和TdT Enzyme 应避免反复冻融和涡旋操作。FITC-12-dUTP Mix使用前，请置于冰上溶解，待完全溶解后离心，用枪头吹打混匀。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. 配制标记工作液和阳性对照DNase I时，建议不要涡旋。

5. 实验过程中请保持样本的湿润，防止干片造成失败。

6. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。

7. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。

8. 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。

**Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.**

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

## Product Data Sheet

### IV 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酶标记过程中标记液渗漏，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酶标记液能很好地覆盖样品。实验前用PAP笔圈出染色区域。
	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 dATP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。
荧光背景高	通透条件不佳，以致于试剂不能到达靶分子或浓度过低。	1.增加通透时间； 2.优化蛋白酶K的作用浓度和作用时间。
	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。
阳性对照无信号	非特异性标记	在操作过程中保持细胞湿润;标记反应完成，载玻片在用 PBS 洗一遍之后，可再用含0.1% Triton X-100 和5mg/ml BSA 的PBS洗3次，每次5min。
	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。
	DNase I工作液的浓度过低。	增加DNase I工作液浓度。
	通透时间不充分	可通过调整Proteinase K或 Triton X-100 的孵育时间优化通透步骤。
组织样本脱落	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。	1.降低蛋白酶K的处理时间。
		2.采用防脱载玻片，比如TESPA或者多聚赖氨酸包被载玻片，阳离子处理载玻片，切片专用防脱载玻片等。

### Background

GlpBio生产的一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒One-step TUNEL Apoptosis Detection Kit (Green, FITC)提供了一种检测细胞和组织在凋亡过程中细胞核DNA断裂程度的方法，Ex/Em = 492/517nm。

细胞在发生凋亡时，会激活一些特异性的DNA内切酶，这些内切酶会将核小体间的基因组DNA切割成180-200bp的整数倍片段，暴露出基因末端的3'-OH。在正常或增殖的细胞中，几乎没有DNA断裂，因此3'-OH的形成很少。TdT酶（脱氧核糖核酸末端转移酶）将绿色荧光标记的dUTP连接到断裂DNA暴露的3'-OH末端，从而可以在荧光显微镜下进行检测。

**Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.**

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

## Product Data Sheet

---

本试剂盒可以用于检测冷冻或石蜡切片中的细胞凋亡情况，也可以检测培养的贴壁细胞的凋亡情况。

为适应实验多种需求，本试剂盒配备了多组分：

1. Proteinase K (2mg/mL)用于样品的通透；
2. DNase I (2U/ $\mu$ L)和10 $\times$ DNase I Buffer用于制备阳性对照样品；
3. 5 $\times$ Equilibration Buffer, FITC-12-dUTP Mix和TdT Enzyme用于配置标记液。

**Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.**

**Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com**

**Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA**