

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒，核心装

说明书修订日期：2017.02.06

Catalog No.: KGA700

Storage: -20°C for 12 months.

For Research Use Only (科研专用)。

一、TUNEL 检测原理

凯基快速型 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒是用来检测细胞在凋亡过程中细胞核 DNA 的断裂情况，其原理是生物素 (Biotin) 标记的 dUTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT Enzyme) 的作用下, 可以连接到凋亡细胞中断裂 DNA 的 3'-OH 末端, 并可与连接辣根过氧化酶的链霉亲和素 (Streptavidin-HRP) 特异结合, 在辣根过氧化酶底物二氨基联苯胺 (DAB) 的存在下, 产生很强的颜色反应 (呈深棕色), 特异准确地定位正在凋亡的细胞, 因而在普通显微镜下即可观察和计数凋亡细胞; 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。本试剂盒适用于组织样本 (石蜡包埋、冰冻和超薄切片) 和细胞样本 (细胞涂片或爬片) 的凋亡原位检测。

二、TUNEL 试剂盒组分

组 份	KGA700 100 assays	储存条件
Equilibration Buffer	5.0 ml	-20°C
TdT Enzyme	400µl	
Biotin-11-dUTP	100µl	
Streptavidin-HRP	50µl	

- ❖ **运输及保存条件:** 2-8°C 低温运输, 收到后于 -20°C 保存。
- ❖ **实验前准备:** 多聚甲醛、二甲苯、乙醇、1×PBS pH 7.4、H₂O₂、Triton X-100、甲醇、苏木素染液、多聚赖氨酸铺载玻片 (细胞样本)、DAB 显色液、盖玻片、染色缸、温盒、量筒等。
- ❖ **注意事项**
 - ❖ 各个样本请用免疫组化笔做好标记, 另外加 2 张样本切片分别用于阳性片和阴性片制备并做好标记。
 - ❖ 在每步反应或浸洗的间隙时, 配制下一步即用的工作液。
 - ❖ 反应液最好根据计算好的样本数量集中配制, 再分别滴加于各样本上, 避免因每个样本单独配制而产生的试剂损耗, TdT 酶反应液如需短暂保存时, 请置于冰上。
 - ❖ 配制好的 DAB 工作液应为浅棕色, 如颜色过深, 请勿使用。
 - ❖ 操作请戴手套, 防止试剂沾染皮肤, 如有沾染请立即用大量清水冲洗。

三、操作步骤

		细胞涂片或冷冻切片	石蜡切片																
一	固定或前处理	<ol style="list-style-type: none"> 1. 将自然晾干的细胞样本（细胞涂片或爬片）或冷冻切片浸入盛有 4%多聚甲醛固定液的染色缸，室温（15-25℃）固定 20-30min； 2. 样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min； 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 切片按常规方法进行脱蜡，60℃烘片 60min 后，二甲苯脱蜡 2 次，乙醇水合（100%、95%、80%、75%）每次 5min； 2. 切片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min； 																
二	通透	<ol style="list-style-type: none"> 3. 样本浸泡于 pH6.0 的柠檬酸缓冲液中，微波中高火 8 分钟左右，再自然晾凉。 4. 切片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min； 																	
三	封闭	<ol style="list-style-type: none"> 5. 配制 3%H_2O_2 封闭液；例：80ml 甲醇加入 10ml H_2O 和 10ml H_2O_2 (30%)，即用即配； 6. 样本片浸入封闭液中，室温（15-25℃）封闭 10min； 7. 样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min； 																	
四	制阳性片（可选）	<ol style="list-style-type: none"> 8. 根据样本类型不同，配制 100μl 含不同活性单位 U 的 DNase I 反应液（可另外购置，凯基货号为 KGA702C），方法如下（注意：阳性片只针对实验体系进行设置对照，不需要每片制备）： <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>样本</th> <th>细胞样本</th> <th>冷冻切片</th> <th>石蜡切片</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>U /100μl</td> <td>1000 U-2000 U</td> <td>2000 U-3000 U</td> <td>3000 U-5000 U</td> </tr> <tr> <td>DNase I (50 U/μl) 用量</td> <td>20μl-40μl</td> <td>40μl-60μl</td> <td>60μl-100μl</td> </tr> <tr> <td>DNase I Buffer 用量</td> <td>80μl-60μl</td> <td>60μl-40μl</td> <td>40μl-0μl</td> </tr> </tbody> </table> 9. 在一张样本上滴加 100μl 上述配制好的 DNase I 反应液，室温~37℃处理 10~30min， 10. 上述阳性片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min； 	样本	细胞样本	冷冻切片	石蜡切片	U /100 μ l	1000 U-2000 U	2000 U-3000 U	3000 U-5000 U	DNase I (50 U/ μ l) 用量	20 μ l-40 μ l	40 μ l-60 μ l	60 μ l-100 μ l	DNase I Buffer 用量	80 μ l-60 μ l	60 μ l-40 μ l	40 μ l-0 μ l	
样本	细胞样本	冷冻切片	石蜡切片																
U /100 μ l	1000 U-2000 U	2000 U-3000 U	3000 U-5000 U																
DNase I (50 U/ μ l) 用量	20 μ l-40 μ l	40 μ l-60 μ l	60 μ l-100 μ l																
DNase I Buffer 用量	80 μ l-60 μ l	60 μ l-40 μ l	40 μ l-0 μ l																
五	连接	<ol style="list-style-type: none"> 11. 配制 TdT 酶反应液：计算好样本数量集中配制（阴性对照片不计入），每个样本用量为：在 45μl Equilibration Buffer 加入 1.0μl Biotin-11-dUTP 和 4.0μl TdT Enzyme，即用即配； 12. 样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50μl TdT 酶反应液，加盖玻片放入温盒中，37℃避光反应 60min，（注：阴性对照样本不加 TdT 酶反应液） 13. 反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min； 																	
六	标记	<ol style="list-style-type: none"> 14. 配制 Streptavidin-HRP 工作液，计算好样本数量集中配制，每个样本用量为：49.5μl 1×PBS 加入 0.5μl Streptavidin-HRP，即用即配，注意避光； 15. 样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50μl Streptavidin-HRP 工作液，加盖玻片放入温盒中，37℃避光反应 30min； 16. 反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min； 																	
七	显色	<ol style="list-style-type: none"> 17. 配制 DAB 工作液（自备，凯基货号为 KGP1045）：计算好样本数量集中配制。 18. 样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50μl DAB 工作液，室温显色反应 30s~5min； 19. 显色后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。 																	
八	复染	<ol style="list-style-type: none"> 20. 苏木素、甲基绿等常规染液复染（自备试剂）：将样本上滴加苏木素染液，染色 30s~5min（请在显微镜下观察确定），蒸馏水冲洗干净后浸入 1%盐酸甲醇溶液中分化 5s，立即用蒸馏水冲洗干净。分别用 70%、85%、95%、无水乙醇浸洗 5min。用二甲苯浸二次，每次 10min。晾干后在切片上加中性树脂胶，加盖玻片，光学显微镜下观察拍照。 																	