

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒，升级装（BIOTIN 标记 POD 法，通用）

说明书修订日期：2018.04.24

Catalog No.: KGA702/ KGA703/ KGA704

Storage: for 12 months; A 盒-20℃, B 盒 2-8℃。

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		KGA702 20 assays	KGA703 50 assays	KGA704 100 assays	储存 条件
A 盒	10×Proteinase K	200μl	500μl	1000μl	-20℃
	DNase I (50 U/μl)	200μl	500μl	1.0 ml	
	DNase I Buffer	200μl	500μl	1.0 ml	
	Equilibration Buffer	1.0 ml	2.5 ml	5.0 ml	
	TdT Enzyme	80μl	200μl	400μl	
	Biotin-11-dUTP	20μl	50μl	100μl	-20℃
B 盒	DAB-A Solution	150μl	300μl	600μl	2-8℃
	DAB-B Solution	150μl	300μl	600μl	
	DAB-C Solution	150μl	300μl	600μl	2-8℃,避光
	Streptavidin-HRP	10μl	25μl	50μl	

- ❖ **运输及保存条件：**2-8℃低温运输，收到后 A 盒于-20℃保存，B 盒于 2-8℃保存，保质期一年。
- ❖ **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），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	<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. 配制 Proteinase K 工作液：计算好样本数量集中配制，每样本 90μl 1×PBS 加入 10μl 10×Proteinase K，即用即配；每个组织切片上滴加 100μl Proteinase K 工作液，37℃反应 30min（组织样本）；细胞贴壁样本建议用预冷的 100μl 1%Triton X-100/10mM PBS 处理 5 分钟（细胞样本）。 注：对于部分固定过久的样本可微波修复，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	<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，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" data-bbox="414 918 1369 1093"> <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 /100μl	1000 U-2000 U	2000 U-3000 U	3000 U-5000 U	DNase I (50 U/μl) 用量	20μl-40μl	40μl-60μl	60μl-100μl	DNase I Buffer 用量	80μl-60μl	60μl-40μl	40μl-0μl	
样本	细胞样本	冷冻切片	石蜡切片																
U /100μl	1000 U-2000 U	2000 U-3000 U	3000 U-5000 U																
DNase I (50 U/μl) 用量	20μl-40μl	40μl-60μl	60μl-100μl																
DNase I Buffer 用量	80μl-60μl	60μl-40μl	40μl-0μl																
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：计算好样本数量集中配制，每个样本用量为：50 μl dH_2O 加入 2.5μl DAB -A Solution，混匀后再加入 2.5 μl DAB-B Solution 和 2.5μl DAB-C Solution，即用即配； 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。 																	