

# 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色 TRITC 标记荧光检测法，通用型）

说明书修订日期：2018.07.31

Catalog No. : KGA7061 / KGA7062 / KGA7063

Storage: -20°C for 12 months, 避光

For Research Use Only (科研专用)

## 一、TUNEL 检测原理

凯基一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (TRITC 红色荧光标记, 通用型) 提供一种高灵敏度又快速简便的细胞凋亡检测方法, 可检测细胞在凋亡过程中细胞核 DNA 的断裂情况, 其原理是红色荧光素 (Tetramethylrhodamine, TRITC) 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, 可用荧光显微镜检测。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, 很少能够被标记。

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。对于经过固定和洗涤的细胞或组织, 只要经过一步染色反应, 洗涤后就可以通过荧光显微镜检测到凋亡细胞。

## 二、TUNEL 试剂盒组分

组 份	Cat: KGA7061 20 assays	Cat: KGA7062 50 assays	Cat: KGA7063 100 assays	储存条件
10×Proteinase K	200 ul	500 ul	1000 ul	-20° C
DNase I (50U/ ul)	200 ul	500 ul	1.0ml	
DNase I Buffer	200 ul	500 ul	1.0ml	
Equilibration Buffer	1.0ml	2.5ml	5.0ml	
TdT Enzyme	80 ul	200 ul	400 ul	
Biotin-11-dUTP	20 ul	50 ul	100 ul	-20° C, 避光
Streptavidin-TRITC	100 ul	250 ul	500 ul	2-8° C, 避光
Labeling Buffer	1.0ml	2.5ml	5.0ml	2-8° C

### ➤ 运输及保存条件:

2-8°C 低温运输, 收到后-20°C 避光保存, 保质期一年。

### ➤ 实验前准备:

实验前按说明书准备好相应试剂与器具, 多聚甲醛、二甲苯、乙醇、1×PBS pH 7.4、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Triton X-100、甲醇、多聚赖氨酸铺载玻片 (细胞样本)、盖玻片、染色缸、温盒、量筒等。

## 三、操作步骤

- 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。

		细胞涂片或冷冻切片	石蜡切片																
一	固定或前处理	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，室温固定 20-30 min； 2. 样本片浸入 1×PBS 洗三次，每次 5min；	1. 石蜡切片按常规方法进行脱蜡，60℃烘片 60min。 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	3. 对于 <b>组织样品</b> ：配 Proteinase K 工作液：计算好样本数量集中配制，每样本 90 ul 1×PBS 加 10 ul 10×Proteinase K，即用即配；每样本上滴加 100 ul Proteinase K 工作液，37℃反应 15-20min； 对于 <b>细胞贴壁样本</b> ：建议用预冷的 100 ul 1%Triton X-100/10mM PBS 处理 5 分钟（细胞样本）。 4. 切片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。 （注：根据样本情况，本步骤可用微波方法：将切片置于 pH6.0 柠檬酸盐缓冲液中，中高火 8min 后晾凉）																	
三	制阳性片	5. （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）根据样本类型不同，配制 100 ul 含不同活性单位 U 的 DNase I 反应液，方法如下： <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <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 /100 ul</td> <td>1000 U-2000 U</td> <td>2000 U-3000 U</td> <td>3000 U-5000 U</td> </tr> <tr> <td>DNase I (50U/ ul) 用量</td> <td>20 ul-40 ul</td> <td>40 ul-60 ul</td> <td>60 ul-100 ul</td> </tr> <tr> <td>DNase I Buffer 用量</td> <td>80 ul-60 ul</td> <td>60 ul-40 ul</td> <td>40 ul-0 ul</td> </tr> </tbody> </table> 6. 在一张样本片上滴加 100 ul 上述配制好的 DNase I 反应液，37℃处理 30min； 7. 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 ul	1000 U-2000 U	2000 U-3000 U	3000 U-5000 U	DNase I (50U/ ul) 用量	20 ul-40 ul	40 ul-60 ul	60 ul-100 ul	DNase I Buffer 用量	80 ul-60 ul	60 ul-40 ul	40 ul-0 ul	
样本	细胞样本	冷冻切片	石蜡切片																
U /100 ul	1000 U-2000 U	2000 U-3000 U	3000 U-5000 U																
DNase I (50U/ ul) 用量	20 ul-40 ul	40 ul-60 ul	60 ul-100 ul																
DNase I Buffer 用量	80 ul-60 ul	60 ul-40 ul	40 ul-0 ul																
四	连接记	8. 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 45 ul Equilibration Buffer 加入 1.0 ul biotin-11-dUTP 和 4.0 ul TdT Enzyme，即用即配，注意避光； 9. 样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50 ul TdT 酶反应液，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）； 10. 反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min，注意避光； 11. 配置 Streptavidin-TRITC 工作液：Streptavidin-TRITC 试剂按每张切片 5 ul 用量与 45 ul Labeling Buffer 混匀，计算所需的总量，即用即配，注意避光。 12. 样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50 ul 配置好的 Streptavidin-TRITC 工作液，放入湿盒，37℃避光反应 30 min。 13. 反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min，注意避光； 14. DAPI 染色液复染细胞核，室温避光反应 10min。洗去 DAPI 染液，加适量体积比封片剂（甘油：PBS=6：4）。																	
五	检测	15. 荧光显微镜检测：激发波长 543nm，发射波长 571nm。（注：荧光易淬灭，请尽快观察拍照）																	

### ➤ 注意事项

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。

操作 Streptavidin-TRITC 时注意避光。