

(本试剂仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(显色法, 通用型)

货号: E-CK-A331

规格: 20 T / 50 T / 100 T

产品编号	产品名称	20 T	50 T	100 T	Storage
E-CK-A331A	平衡液	1.0 mL	1.25 mLx2	5.0 mL	-20°C
E-CK-A331B	TdT 酶	80 µL	200 µL	400 µL	-20°C
E-CK-A331C	蛋白酶 K(50 ×)	40 µL	100 µL	200 µL	-20°C
E-CK-A331D	Streptavidin-HRP	10 µL	25 µL	50 µL	2~8°C
E-CK-A331E	Biotin-dUTP	20 µL	50 µL	100 µL	-20°C
E-CK-A331F	DAB 浓缩液(20 ×)	200 µL	500 µL	1 mL	-20°C
E-CK-A331G	DAB 稀释液	4 mL	10 mL	10 mLx2	-20°C

说明书 一份

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

全国免费电话 400-9627-365
销售部电话 027-65022280, 027-87854967
技术部电话 027-65521719
电子邮箱(销售) Perry@elabscience.cn
电子邮箱(技术) Flow@elabscience.cn
QQ 客服 800110755
网址 www.elabscience.cn

联系时请提供产品货号(见标签)，以便我们更高效地为您服务。

产品简介

Elabscience®自主研发的 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。待测细胞或组织样本经过生物素标记和 DAB 显色等步骤后，即可在普通光学显微镜下检测到细胞凋亡。

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、爬片)的原位凋亡检测。

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(TdT)的催化下加上生物素标记的 dUTP，辣根过氧化物酶(HRP)标记的 Streptavidin (Streptavidin-HRP)可与之结合，在 HRP 的催化下通过 DAB 显色可观测到凋亡细胞，从而可通过普通光学显微镜检测到细胞的凋亡。由于正常的或正在增殖的细胞中几乎没有 DNA 的断裂，因而没有 3'-OH 形成，很少能够被标记。这就是 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法检测细胞凋亡的原理。

自备试剂

1、细胞样本

固定液(4%多聚甲醛溶于 PBS 中，推荐使用 Elabscience®E-IR-R113)。

阻断液(3%的 H₂O₂ 溶于去离子水，推荐使用 Elabscience®E-IR-R115)。

通透液(0.1%的 Triton-100 溶于 0.1%柠檬酸钠，推荐使用 Elabscience®E-IR-R122)。

2、石蜡切片

二甲苯、乙醇、PBS(推荐使用 Elabscience®E-IR-R187)。

阻断液(3%的 H₂O₂ 溶于去离子水，推荐使用 Elabscience®E-IR-R115)。

3、冰冻切片

固定液(4%多聚甲醛溶于 PBS 中，推荐使用 Elabscience®E-IR-R113)。

阻断液(3%的 H₂O₂ 溶于去离子水，推荐使用 Elabscience®E-IR-R115)。

通透液(0.1%的 Triton-100 溶于 0.1%柠檬酸钠，推荐使用 Elabscience®E-IR-R122)。

4、阳性样本：DNase I

5、其他试剂

PBS、苏木素(核染色液，推荐使用 Elabscience®E-IR-R120)、中性树胶(推荐使用 Elabscience®E-IR-R118)。

产品使用说明

1、蛋白酶 K(50 ×)[E-CK-A331C]为浓缩液，实验前用 PBS 稀释成 1×蛋白酶 K 工作液。

例如，取 10 μL 蛋白酶 K (50 ×) [E-CK-A331C]，加入到 490 μL 的 PBS 中，混匀即为 1×蛋白酶工作液

2、DAB 浓缩液(20 ×)[E-CK-A331F]为浓缩液，实验前用 DAB 稀释液[E-CK-A331G]稀释

成 1×DAB 工作液。

例如，取 10 μL 的 DAB 浓缩液(20 ×) [E-CK-A331F]，加入 190μL 的 DAB 稀释液[E-CK-A331G]，混匀后即为 1×DAB 工作液。

实验操作指南

TUNEL 检测时样本的预处理是实验的关键所在，本说明书推荐的条件为普遍情况，用户需根据自己的样本材料及首次实验结果来调整实验条件，如处理时间、浓度等，以优化出适合样本的实验条件。

1. 样本处理

A、细胞样本

- 1) 细胞涂片或爬片自然晾干。
- 2) 晾干的样本浸入固定液，室温(15~25°C)固定 15-60 min。
(固定液的配制：4%多聚甲醛溶于 pH7.4 的 PBS 中，现配现用)
- 3) 固定好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 4) 用吸水纸吸干水分后，样本浸入阻断液中，室温(15~25°C)封闭 10min。
(阻断液的配制：3%的 H₂O₂ 溶于去离子水)
- 5) 封闭好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 6) 用吸水纸吸干水分后，样本浸入通透液中，冰上(2~8°C)促渗 2 min。
(通透液的配制：0.1%的 Triton-100 溶于 0.1%柠檬酸钠，现配现用)
- 7) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

注意：

- 1) 为防止样本脱落，请使用硅烷(Silane)处理的载玻片或采用多聚赖氨酸铺片。
- 2) 固定好的样本可在-20°C 的 70%乙醇中放置 30 min 或过夜，以改善细胞的渗透性。
- 3) 使用 PBS 漂洗细胞样本时，不要直接加在细胞样本上，以防细胞样本的脱落。
- 4) 固定液、PBS、阻断液、通透液和染色缸等需用户自备。

B、石蜡切片

- 1) 按常规方法将石蜡切片进行脱蜡水合。
(例如：二甲苯脱蜡 2 次，每次 5-10 min，乙醇水合(将脱蜡好的切片依次放入 100%乙醇、95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇，每次 2 min))
- 2) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 3) 用吸水纸吸干水分后，样本中加入 1×蛋白酶 K 工作液，20~37°C 作用 15~30 min。
(蛋白酶 K 工作液配制：2 μL 的 50 × 蛋白酶 K[E-CK-A332C]加入到 98μL 的 PBS 中，混匀)
- 4) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 5) 用吸水纸吸干水分后，样本浸入阻断液中，室温(15~25°C)封闭 10 min。
(阻断液的配制：3%的 H₂O₂ 溶于去离子水)
- 6) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

注意：蛋白酶 K 处理的浓度和时间及温度，因组织的类型不同而有所不同，需用户摸索条件后确定。

C、冰冻切片

- 1) 冰冻切片浸入固定液，室温(15~25°C)固定 30 min。
(固定液的配制：4%多聚甲醛溶于 pH7.4 的 PBS 中，现配现用)
- 2) 样本浸入 PBS 漂洗 2 次，每次 15 min。
- 3) 用吸水纸吸干水分后，样本浸入阻断液中，室温(15~25°C)封闭 10 min。
(阻断液的配制：3%的 H₂O₂ 溶于去离子水)
- 4) 样本浸入 PBS 漂洗 2 次，每次 5min。
- 5) 用吸水纸吸干水分后，样本浸入通透液中，冰上(2~8°C)促渗 2 min。
(通透液的配制：0.1%的 Triton-100 溶于 0.1%柠檬酸钠，现配现用)
- 6) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

D、阳性及阴性对照的准备

TUNEL 检测时需设置阳性和阴性对照，以显示实验的客观性及准确性。因此需按照下述方法准备阳性和阴性样本，其余步骤与待测样本同样进行。

1) 阳性对照样本的准备：

样本按照前面的实验步骤处理后，加入 100 μL 的 DNase I(客户自备)室温(25~37°C)处理 10~30 min，其余步骤均相同。

(DNase I 反应液的配制：10 U-3000 U DNase I, 40 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂)

2) 阴性对照样本的准备：

在下述的实验操作过程中标记反应(TdT 酶工作液)不添加 TdT 酶，其余步骤相同。

2. 标记和显色反应

A、试剂配制

1) TdT 酶工作液配制

参考下表配制适当的 TdT 酶工作液(根据实际需要配制)，充分混匀，现配现用。

	1个样品	5个样品	10个样品
平衡液	45 μl	225 μl	450 μl
Biotin-dUTP	1 μl	5 μl	10 μl
TdT 酶	4 μl	20 μl	40 μl
TdT 酶工作液总体积	50 μl	250 μl	500 μl

2) Streptavidin-HRP 工作液配制

参考下表配制适量的 Streptavidin-HRP 工作液，充分混匀，现配现用。

	1个样品	5个样品	10个样品
Streptavidin-HRP	0.5 μl	2.5 μl	5 μl
PBS	99.5 μl	497.5 μl	995 μl
Streptavidin-HRP 工作液总体积	100 μl	500 μl	1000 μl

3) 1×DAB 工作液配制

参考下表配制适量的 DAB 工作液，需充分混匀，现配现用。

	1个样品	5个样品	10个样品
20×DAB(10 mg/ml)	5 μl	25 μl	50 μl
DAB 稀释液	95 μl	475 μl	950 μl
DAB 工作液总体积	100 μl	500 μl	1000 μl

B、标记和显色

- 1) 样本用 PBS 漂洗 2 次，每次 5 min，样本周围用滤纸或吸水纸吸干。
- 2) 每个样本滴加 50 μL 的 TdT 酶工作液，加盖玻片于 37°C 湿盒避光反应 60 min(阴性对照样本不加 TdT 酶)。
- 3) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 4) 用滤纸或吸水纸吸干样本周围的水分，滴加 50 μL 的 Streptavidin-HRP 工作液，加盖玻片于 37°C 湿盒避光反应 30 min。
- 5) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 6) 用滤纸或吸水纸吸干样本周围的水分，滴加 50~100 μL 的 DAB 工作液，室温孵育 30 s~5 min 或根据显色情况孵育适当时间。

注：如果显色强，可在显微镜下观察到棕色即停止显色；如显色弱，可适当延长显色时间甚至过夜。

- 7) 显色完成后样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 8) (选做)：苏木素染色液进行细胞核染色，随后用 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 9) 将切片置于水中冲洗后，将切片依次放入：70%酒精-80%酒精-90%酒精-95%酒精-无水乙醇 I -无水乙醇 II -二甲苯 I -二甲苯 II 中脱水透明，每个试剂中放置 2 min，最后在通风橱中风干切片。
- 10) 将中性树胶滴在组织旁边，再用盖玻片盖上。先放平一侧，然后轻轻放下另一侧，以免产生气泡，封好的切片平躺置于通风橱中晾干。
- 11) 光学显微镜下观察、拍照。

保存条件

Streptavidin-HRP[E-CK-A331D] 保存于 2~8°C，其余试剂-20°C 保存。Streptavidin-HRP[E-CK-A331D]和 DAB[E-CK-A331F]需避光保存。

注意事项

1. 保质期 1 年。为获得最佳的使用效果，请在 3~6 个月内使用。
2. TUNEL 法特异性检测细胞凋亡时产生的 DNA 断裂, 但不会检测出射线等诱导的 DNA 断裂。一方面可以把凋亡和坏死细胞区分开，另一方面不会把射线等诱导发生 DNA 断裂的非凋亡细胞判断为凋亡细胞。极少数细胞凋亡时没有 DNA 断裂，此时不适用 TUNEL 法检测。在个别类型的坏死细胞中也发现 TUNEL 检测呈阳性。在需要严格判断细胞凋亡的情况下，最好同时检测多个凋亡指标。
3. PBS 清洗样本后，请尽量除去 PBS 溶液后再进行下一步操作。
4. 实验过程中请保持样本的湿润，防止干片造成的实验失败。
5. 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。
6. 如果 20×DAB 溶液颜色变深成为紫色，则不可使用，需重新配制。
7. 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。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。