

(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(增强型绿光，通用型)

货号：E-CK-A334

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-A334A	平衡液(5x)	700 µL	900 µLx 2	3.6 mL	-20°C
E-CK-A334B	TdT 酶	20 µL	50 µL	100 µL	-20°C
E-CK-A334C	蛋白酶 K(100 ×)	20 µL	50 µL	100 µL	-20°C
E-CK-A334D	增强型荧光标记液	100 µL	250 µL	500 µL	-20°C
E-CK-A334E	DNase I(2 U/µL)	5 µL	13 µL	25 µL	-20°C
E-CK-A334F	DNase I Buffer(10 x)	100 µL	250 µL	500 µL	-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® 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。检测结果可通过荧光显微镜直接观察。

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)的催化下加上荧光素-12-脱氧三磷酸尿苷(FITC-12-dUTP),即可通过荧光显微镜直接观察。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。这就是 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法检测细胞凋亡的原理。

试剂盒中的增强型荧光标记液,包含 FITC-12-dUTP 和荧光增强型因子,荧光增强因子与 FITC 非共价结合,增强稳定性并放大信号,使标记的荧光更亮且抗淬灭能力更强。

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)。

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)。

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)。

4、其他试剂

PBS、ddH₂O、DAPI(推荐使用 Elabscience®E-IR-R187)、含抗荧光淬灭剂的封片液(推荐使用 Elabscience®E-IR-R119)。

产品使用说明

蛋白酶 K(100 ×)[E-CK-A334C]为浓缩液,实验前用 PBS 稀释成 1×蛋白酶 K 工作液。

例如,取 1 μL 蛋白酶(100 ×) [E-CK-A334C],加入到 99 μL 的 PBS 中,混匀即为 1×蛋白酶工作液。

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) 吸干样本周围的水分后, 将样本中加入蛋白酶 K 工作液, 20~37°C 作用 5 min; 也可以浸于通透液中, 冰上(2~8°C)促渗 2 min。

(蛋白酶K工作液配制: 1 μ L 的 100 x 蛋白酶 K[E-CK-A334C]加入到 99 μ L 的 PBS 中, 混匀)

(通透液的配制: 0.1%的 Triton-100 溶于 0.1%柠檬酸钠, 现配现用)

注意: 细胞爬片或涂片处理时容易脱片, 建议使用 Triton-100 通透液, 避免因通透导致的脱片。

5) 将样本浸入 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、封闭液、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) 吸干样本周围的水分后, 将样本中加入蛋白酶 K 工作液, 20~37°C 作用 15-30 min。

(蛋白酶K工作液配制: 1 μ L 的 100 x 蛋白酶 K[E-CK-A334C]加入到 99 μ L 的 PBS 中, 混匀)

4) 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 5min。

3) 吸干样本周围的水分后, 将样本中加入蛋白酶 K 工作液, 20~37°C 作用 15-30 min。

(蛋白酶K工作液配制: 1 μ L 的 100 x 蛋白酶 K[E-CK-A334C]加入到 99 μ L 的 PBS 中, 混匀)

4) 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的操作, 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 μ L 的 DNase I 工作液室温(25~37°C)处理 10~30 min, 其余步骤均相同。

- a) 按照 1:10 的比例用 ddH₂O 将 DNase I Buffer(10 ×)[E-Ck-A334F]稀释成 1× DNase I Buffer 工作液备用。
- b) 滴加 100 μL 的 1× DNase I Buffer 工作液到已通透的样本上，室温平衡 5 min。
- c) 用 1× DNase I Buffer 工作液按照 1:100 稀释比将 DNase I(2 U/μL)[E-CK-A334E] 稀释成 DNase I 工作液(20 U/mL)。
- d) 吸除样本上的多余液体，加入 100μL 稀释后的 DNase I 工作液(20 U/mL)。室温孵育 10~30 min。
- e) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

注意：

- 1)DNase I 处理固定的细胞会引起染色体断裂，产生许多可标记的 DNA 3'末端。故后续实验操作会引起大多数细胞被荧光标记物标记上。
- 2)每个样本需要准备 200 μL 的 1×DNase I Buffer 工作液。
- 3)阳性样本对照载玻片必须使用单独的染色缸，以免玻片上残留的 DNase I 引起实验组中的假阳性信号。

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，其余步骤均相同。

2. 标记和显色反应

A、试剂配制

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
ddH ₂ O	34 μl	170 μL	340μl
平衡液(5 ×)	10 μl	50 μl	100 μl
荧光标记液	5 μl	25 μl	50 μl
TdT 酶	1 μl	5 μl	10 μl
TdT 酶工作液总体积	50 μl	250 μl	500 μl

B、标记和显色

- 1) 按照 1:5 的比例用 ddH₂O 将平衡液(5×)[E-CK-A334A]稀释成 1× 平衡液工作液。每个样本滴加 100 μL 1× 平衡液工作液，室温平衡 10~30 min。
- 2) 吸水纸吸除 1× 平衡液工作液，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) 吸水纸吸干水分后，滴加 DAPI 避光孵育 5 min，对标本进行染核。
- 5) 样本浸入 PBS 漂洗 4 次，每次 5 min。用吸水纸吸干多余的液体，用含抗荧光淬灭剂的封片液封片。
- 6) 荧光显微镜下观察，可选用的激发波长范围为 450~500 nm，发射波长为 515~565 nm(绿色荧光)。

保存条件

-20°C 保存。增强型荧光标记液[E-CK-A334D]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. 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。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。