



## TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit

### ——TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒

产品货号	包装规格
<b>A049</b>	<b>50 次</b>

储存条件：-20℃，避光保存。

## 产品说明书

安迪福诺生物科技（武汉）有限公司

Wuhan ABP-Biosciences Co.,Ltd

武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号  
武汉光谷国际生物医药企业加速器 1 号楼 511

邮编：430000

电话：400-066-7718

邮箱：[sales@abpbio.cn](mailto:sales@abpbio.cn)

网址：[www.abpbio.com](http://www.abpbio.com) (英文)

[www.abpbio.com.cn](http://www.abpbio.com.cn) (中文)

## TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit

产品货号: A049

试剂盒组份:

组份	试剂名称	包装	浓度	储存条件
组份 A	TdT reaction buffer	8 ml	1xsolution	-20 °C, 避光
组份 B	TdT enzyme	100 µl	15 U/µl	
组份 C	Biotin-11-dUTP	50 µl	50xsolution	
组份 D	HRP-Streptavidin	50 µl	100xsolution	
组份 E	DAB stock solution	150 µl	33xsolution	
组份 F	DAB diluent	5 ml	1xsolution	
组份 G	DNase I	10 µl	2 U/µl	
组份 H	DNase I buffer	1 ml	1xsolution	

注: 按照推荐的储存条件保存有效期为 1 年。

### 产品介绍

TUNEL细胞凋亡检测是一种简便、快速、灵敏的细胞凋亡检测方法。该方法用来检测细胞在凋亡晚期细胞核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的DNA 的3'-OH 末端,通过生物素-链霉亲和素放大系统,使荧光素标记的链霉亲和素与生物素结合,从而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。

### 实验所需耗材（不包含在试剂盒中）

- PBS
- 含 4%甲醛的 PBS
- 含 0.2% Triton X-100 的 PBS
- 含 3% BSA 的 PBS
- 2% hydrogen peroxide
- 2X SSC buffer: 300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate
- Staining buffer: 0.6 M NaCl, 60 mM sodium citrate, 0.1% Triton X-100, 1% BSA, pH 7.4
- Hematoxylin counterstain
- 封片液
- 脱蜡溶剂 (可选)
- Proteinase K (可选)

## 操作步骤

### 样品准备

#### 1. 细胞样本或冷冻组织切片

**注意：**凋亡细胞可能容易脱落，在洗涤过程中容易损失脱落的细胞。如果需要检测脱落细胞的凋亡情况，可以收集细胞上清液，按照悬浮细胞的操作方法进行细胞凋亡检测。

- 1.1 用 PBS 洗涤细胞或组织切片，重复一次。
- 1.2 用含 4% 甲醛的 PBS (PH7.4) 固定细胞或组织切片，4°C 孵育 30 分钟。（对于固定的冷冻组织切片可以省略此步骤）
- 1.3 用 PBS 洗涤细胞或组织切片，重复一次。
- 1.4 用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 进行通透处理，室温孵育 30 分钟。
- 1.5 用 PBS 洗涤细胞或组织切片，重复一次。

#### 2. 石蜡包埋组织切片

2.1 按照如下表格对石蜡切片进行脱蜡、水化处理。

二甲苯	二甲苯	100% EtOH	100% EtOH	95% EtOH	85% EtOH	75% EtOH	1X PBS	1X PBS
5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	3 min	3 min	5 min	5 min

- 2.2 用 PBS 轻轻润洗切片，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体。
- 2.3 准备 1×蛋白酶 K 溶液。用 PBS 按照 1:50 比例稀释 50×蛋白酶 K (组份 G)。
- 2.3 每个样本上滴加 50 μl 1×蛋白酶 K 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 30 分钟。**注意：**根据不同组织切片的类型，可能需要优化 Proteinase K 孵育的时间和温度
- 2.4 用 PBS 润洗切片二次，每次 5 分钟。

#### 准备阳性对照（可选）

- 3.1 用去离子水润洗细胞，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体。
- 3.2 加入 50 μl DNase I buffer (组份 F) 到固定的细胞中，室温孵育 5 分钟。
- 3.3 按照如下表格制备 DNase I 溶液，混合均匀。**注意：**剧烈摇动会导致 DNase I 变性，请混合时要小心。

试剂	样品数量		
	1	2	3
DNase I (组份 E)	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L	3 $\mu$ L
DNase I buffer (组份 F)	49 $\mu$ L	98 $\mu$ L	147 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	150 $\mu$ L

3.4 轻叩掉液体，每个样本上滴加 50  $\mu$ l DNase I 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 30 分钟。

3.5 用去离子水润洗细胞，并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体。

## 标记与检测

4.1 每个样本滴加 100  $\mu$ l 2% hydrogen peroxide, 使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 5 分钟。

4.2 用 PBS 润洗二次，每次 5 分钟。

4.3 每个样本滴加 100  $\mu$ l TdT reaction buffer (组份 A)，使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 10 分钟。

4.4 按照如下表格，制备 TdT 反应混合液，现用现配，注意避光。

试剂	反应数量				
	1	2	4	5	10
TdT reaction buffer	47 $\mu$ l	94 $\mu$ l	188 $\mu$ l	376 $\mu$ l	470 $\mu$ l
TdT enzyme	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	8 $\mu$ l	16 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Biotin-11-dUTP	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	8 $\mu$ l	10 $\mu$ l
总体积	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	400 $\mu$ l	500 $\mu$ l

**注意：**反应液最好根据计算好的反应数量集中配制，再分别加到各样本上，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。

**阴性对照体系：**准备一份不含 TdT 酶的对照反应混合液，用 dH<sub>2</sub>O 替代 TdT 酶。

4.5 用滤纸小心吸掉 TdT reaction buffer，往每个样本滴加 50  $\mu$ l TdT 反应混合液，使混合液完全覆盖整个样本。

4.6 用塑料盖玻片盖在细胞上以确保 TdT 反应混合液均匀覆盖细胞或组织切片样本。

4.7 将含样本的载玻片置于密闭的湿盒内，在 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟，注意避光。对于组织切片样本，孵育时间可能需要 2 小时。

4.8 移除塑料盖玻片，用含有 3%BSA 的 PBS 润洗细胞两次，每次 5 分钟。

4.9 按照如下表格，制备 HRP-Streptavidin 染色液。

试剂	反应数量				
	1	2	4	5	10
<b>HRP-Streptavidin</b>	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l
<b>Staining buffer</b>	99 $\mu$ l	198 $\mu$ l	396 $\mu$ l	495 $\mu$ l	990 $\mu$ l
总体积	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	400 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1000 $\mu$ l

4.10 每个样本中滴加 100  $\mu$ l Andy Fluor™ 647-Streptavidin 染色液，室温孵育 30 分钟，注意避光。对于组织切片样本，孵育时间可能需要 1 小时。

4.11 用含有 3%BSA 的 PBS 润洗细胞两次，每次 5 分钟。

4.12 按照如下表格，制备 DAB 染色液。

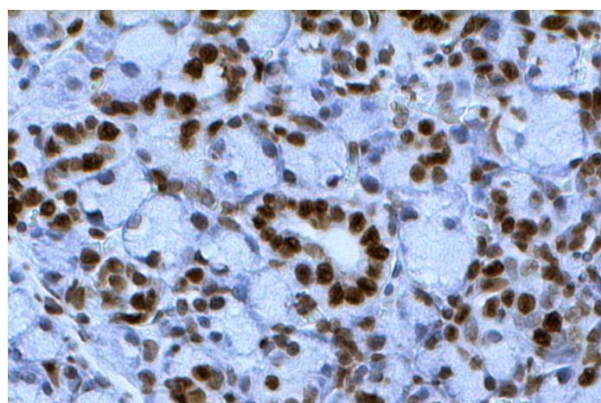
试剂	反应数量				
	1	2	4	5	10
<b>DAB stock solution</b>	3 $\mu$ L	6 $\mu$ L	12 $\mu$ L	15 $\mu$ L	30 $\mu$ L
<b>DAB diluent</b>	97 $\mu$ L	194 $\mu$ L	388 $\mu$ L	485 $\mu$ L	970 $\mu$ L
总体积	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	400 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1000 $\mu$ L

4.13 每个样本中滴加 100  $\mu$ l DAB 染色液，室温孵育。观察颜色变化，达到理想颜色后用 PBS 润洗来终止反应。

4.14 用 hematoxylin 染色液复染细胞核。洗涤后，加适量封片液，用盖玻片封片。

4.15 用光学显微镜观察样本。

## 实验案例



老鼠舌组织细胞凋亡检测结果图