

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

说明书修订日期：2018.05.09

Catalog No.: KGA7071 / KGA7072 / KGA7073

Storage: -20°C for 12 months

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为您提供了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 FITC 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。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: KGA7071 20 assays	Cat: KGA7072 50 assays	Cat: KGA7073 100 assays	储存条件
10×Proteinase K	200μl	500μl	1000μl	-20°C
DNase I (50 U/μl)	200μl	500μl	1.0ml	
DNase I Buffer	200μl	500μl	1.0ml	
Equilibration Buffer	1.0ml	2.5ml	5.0ml	
TdT Enzyme	80μl	200μl	400μl	
Biotin-11-dUTP	20μl	50μl	100μl	-20°C
Streptavidin-Fluorescein	100μl	250μl	500μl	4°C避光
Labeling Buffer	1.0ml	2.5ml	5.0ml	4°C

❖ 运输及保存条件：

2-8°C低温运输，收到后-20°C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、H₂O₂、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	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 20-30min； 2. 样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，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. 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 10μl 10×Proteinase K 的比例配制，即用即配； 4. 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）。 5. 切片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min； （注意：根据样本情况，本步骤可选用微波方法：将切片置于 pH6.0 柠檬酸盐缓冲液中，微波中高火 8min 后，取出晾凉）																	
三	制阳性片	6. （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 100μl 含不同活性单位 U 的 DNase I 反应液，方法如下： <table border="1"> <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> 7. 在一张样本片上滴加 100μl 上述配制好的 DNase I 反应液，37℃处理 30min； 8. 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																
四	连接标记	9. 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，注意避光； 10. 样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50μl 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） 11. 反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min，注意避光； 12. Streptavidin-Fluorescein 试剂按每张切片 5ul 用量与 45ul Labeling Buffer 混匀，计算所需的总量后，即用即配，注意避光。 13. 样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50μl Streptavidin-Fluorescein 标记液，放入湿盒，37℃避光反应 30 min。 14. 反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min，注意避光； 15. 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），显微镜观察。																	
六	检测	16. 荧光显微镜检测：激发波长 450-500nm，发射波长 515-565nm；（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-Fluorescein 时注意避光。