



TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit

——TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒

产品货号	包装规格
A049	50次

储存条件：-20℃，避光保存。

产品说明书

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编：510663

电话：4006-020-200

邮箱：sales@igenebio.com

网址：www.abpbio.com（英文） www.igenebio.com（中文）

© 2016 GeneCopoeia, Inc.

TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit

——TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒

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	1×solution	-20 °C, 避光。
组份 B	TdT enzyme	100 µl	15 U/µl	
组份 C	Biotin-11-dUTP	50 µl	50×solution	
组份 D	HRP-Streptavidin	50 µl	100×solution	
组份 E	DAB stock solution	150 µl	33×solution	
组份 F	DAB diluent	5 ml	1×solution	
组份 G	DNase I	10 µl	2 U/µl	
组份 H	DNase I buffer	1 ml	1×solution	

注: 按照推荐的储存条件保存有效期为 1 年。试剂盒规格为 50 次反应。

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, 几乎不被标记。并且 TUNEL 法只特异性检测细胞凋亡时产生的 DNA 断裂, 而不会检测出坏死细胞以及射线、药物干预等诱导的 DNA 断裂(和细胞凋亡时的断裂方式不同)。

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 (贴壁细胞、悬浮细胞、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 缓冲液
- 含 4% 多聚甲醛的 PBS
- 含 0.2% Triton X-100 的 PBS
- 含 3% BSA 的 PBS
- 2% 过氧化氢
- 2X SSC 缓冲液 (柠檬酸钠缓冲液): 300 mM 氯化钠, 30 mM 柠檬酸钠

- Staining buffer: 0.6 M 氯化钠, 60 mM 柠檬酸钠, 0.1% Triton X-100, 1% BSA, pH 7.4
- 苏木精染液
- 封片液
- 脱蜡溶剂 (可选)
- 蛋白酶 K (可选)

操作步骤

- 注意:** a) 对于贴壁细胞、细胞涂片或爬片, 需要注意凋亡细胞可能容易脱落, 特别是在洗涤过程中容易损失脱落的细胞, 因此洗涤步骤须尽量轻柔。如需检测贴壁细胞样本中脱落细胞的凋亡情况, 可收集细胞上清液, 按照悬浮细胞的操作方法进行细胞凋亡检测。
- b) 对于悬浮细胞, 需收集细胞置于离心管中, 注意每一步加样操作完成后需离心并去上清, 方可进行下一步操作。也可固定后制成细胞涂片, 按照细胞涂片的操作方法即可。
- c) 对于组织样本, 如无特殊说明, 直接按操作步骤进行。

样品准备

1. 细胞样本或冷冻组织切片

- 1.1 用 PBS 洗涤细胞样本或组织切片, 重复一次。
- 1.2 用含 4% 多聚甲醛的 PBS (pH 7.4) 固定细胞样本或组织切片, 4℃ 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 洗涤细胞样本或组织切片, 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 洗涤细胞样本或组织切片, 重复一次。
- 1.6 转步骤 3 或 4。

2. 石蜡包埋组织切片

2.1 按照如下表格从左到右的操作顺序对组织切片进行脱蜡、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 用 PBS 配制 20 µg/mL 的蛋白酶 K 溶液, 使用后分装剩余的蛋白酶 K 溶液, -20℃ 保存。
- 2.4 每个样本上滴加 100 µl 配制好的 20 µg/mL 蛋白酶 K 溶液, 使其被完全覆盖, 室温孵育 30 分钟。**注意:** 根据不同组织切片的类型, 可能需要优化蛋白酶 K 孵育的时间和温度。
- 2.5 用 PBS 润洗两次, 每次 5 分钟。

2.6 转步骤 3 或 4。

3. 准备阳性对照（可选）

注意：利用 DNase I 引起的 DNA 链断裂作为 TUNEL 阳性对照。

3.1 用去离子水润洗样本，并用滤纸小心吸干多余的液体。

3.2 加入 50 μ l DNase I buffer（组份 H）到样本中，室温孵育 10 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，请混合时小心。

试剂	样品数量		
	1	2	3
DNase I (组份 G)	1 μ l	2 μ l	3 μ l
DNase I buffer (组份 H)	49 μ l	98 μ l	147 μ l
总体积	50 μ l	100 μ l	150 μ l

3.4 用滤纸小心吸干 DNase I buffer，每个样本上滴加 50 μ l DNase I 溶液，使其完全覆盖样本，室温孵育 30 分钟。

3.5 用去离子水润洗样本，并用滤纸小心吸干多余的液体。

4. 标记与检测

4.1 每个样本滴加 100 μ l 2%过氧化氢，使其完全覆盖样本，室温孵育 5 分钟，用来灭活内源性过氧化物酶。

4.2 用 PBS 润洗两次，每次 5 分钟。

4.3 每个样本滴加 100 μ l TdT reaction buffer（组份 A），使其完全覆盖样本，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(组份 A)	47 μ l	94 μ l	188 μ l	376 μ l	470 μ l
TdT enzyme(组份 B)	2 μ l	4 μ l	8 μ l	16 μ l	20 μ l
Biotin-11-dUTP(组份 C)	1 μ l	2 μ l	4 μ l	8 μ l	10 μ l
总体积	50 μ l	100 μ l	200 μ l	400 μ l	100 μ 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 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 enzyme 的对照反应混合液，用去离子水替代 TdT enzyme。

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

4.6 对于细胞样本，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 分钟。对于组织切片，孵育时间可能需要 2 小时。

a) 对于贴壁细胞和组织切片，将样本置于密闭的湿盒内。

b) 对于悬浮细胞，可将置于离心管的细胞样本放于摇床上避光孵育，或每隔 15 分钟轻弹离心管使细胞重悬，保证样本充分接触反应液。

4.7 用 2X SSC 缓冲液终止反应，室温孵育两次，每次 10 分钟。

4.8 用含有 3% BSA 的 PBS 室温孵育两次，每次 10 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
HRP-Streptavidin(组份 D)	1 μ l	2 μ l	4 μ l	5 μ l	10 μ l
Staining buffer	99 μ l	198 μ l	396 μ l	495 μ l	990 μ l
总体积	100 μ l	200 μ l	400 μ l	500 μ l	1000 μ l

(Staining buffer: 0.6 M 氯化钠, 60 mM 柠檬酸钠, 0.1% Triton X-100, 1% BSA, pH 7.4)

4.10 每个样本中滴加 100 μ l HRP-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 室温孵育两次，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
DAB stock solution (组份 E)	3 μ l	6 μ l	12 μ l	15 μ l	30 μ l
DAB diluent (组份 F)	97 μ l	194 μ l	388 μ l	485 μ l	970 μ l
总体积	100 μ l	200 μ l	400 μ l	500 μ l	1000 μ l

4.13 每个样本中滴加 100 μ l DAB 染色液，室温孵育。镜下观察颜色变化，达到理想染色效果后立即用 PBS 润洗终止反应。**注意：**悬浮细胞可于加入 DAB 染色液后，吸取少量带细胞的液体滴于载玻片上并于镜下观察颜色变化。染色终止后再吸取少量细胞滴至干净载玻片上并封片。

4.14 必要时用苏木精染色液复染。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

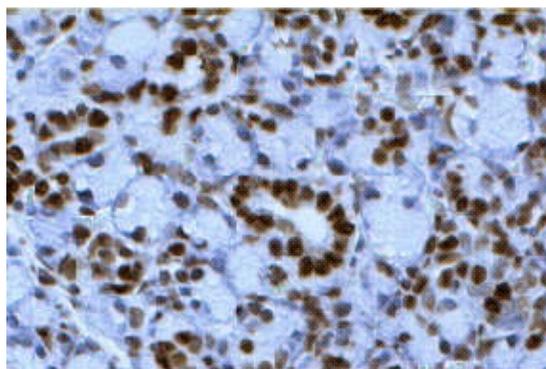


图 1：使用本试剂盒进行老鼠舌组织细胞凋亡检测结果示意图

VIII. 使用许可与质量保证

使用限制

以下条款适用于 TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit 产品。若您不能接受这些条款，请在 5 个自然日内将产品完整退还给 GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得使用于人体或诊断、治疗。未经 GeneCopoeia 事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

质量保证

GeneCopoeia 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经 GeneCopoeia 证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia 将为您替换产品。若无法替换，GeneCopoeia 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia 仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料和试剂产生的损耗，GeneCopoeia 不承担责任。GeneCopoeia 不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 GeneCopoeia 的产品有任何问题或疑虑，请拨打电话 4006-020-200 联系我们。

© 2016, GeneCopoeia, Inc

GeneCopoeia, Inc.
9620 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850
Tel: 301-762-0888 Fax: 301-762-3888
Email: inquiry@genecopoeia.com
Web: www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司
广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号
广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com (英文) www.igenebio.com (中文)