

TUNEL细胞凋亡检测试剂盒 (HRP-DAB显色法)

货号: P-CA-007

产品简介

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (HRP-DAB 显色法) 灵敏度高、操作简便。

本试剂盒适用于组织样本 (石蜡切片、冰冻切片) 和细胞样本 (细胞涂片、爬片) 的原位凋亡检测, 检测结果可通过普通光学显微镜观察。

检测原理

细胞在发生凋亡时, 会激活一些特异性的 DNA 内切酶, 这些内切酶会切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) 的催化下与生物素标记的 dUTP 连接, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 Streptavidin (Streptavidin-HRP) 可与生物素结合, 在 HRP 的催化下通过 DAB 显色来观测凋亡细胞, 结果可通过普通光学显微镜进行观察。

检测样本类型

细胞样本 石蜡切片 冰冻切片

产品组分

产品名称	20Assays	50Assays	100Assays	Storage
TdT Equilibration Buffer	4 mL	9 mL	9 mL × 2	-5~-20°C
TdT Enzyme	100 μL	250 μL	250 μL × 2	-5~-20°C
Proteinase K (100×)	20 μL	50 μL	100 μL	-5~-20°C
Streptavidin-HRP	10 μL	25 μL	50 μL	-5~-20°C, 避光
Biotin-dUTP	100 μL	250 μL	500 μL	-5~-20°C
DAB Concentrate (20×)	200 μL	500 μL	1 mL	-5~-20°C, 避光
DAB Dilution Buffer	4 mL	10 mL	10 mL × 2	-5~-20°C
DNase I (20 U/μL)	5 μL	13 μL	25 μL	-5~-20°C
DNase I Buffer (10×)	300 μL	700 μL	1500 μL	-5~-20°C
说明书			一份	

保存条件

-5~-20°C 保存, 保质期一年。Streptavidin-HRP 和 DAB Concentrate (20×) 需避光保存。

网站: www.procell.com.cn

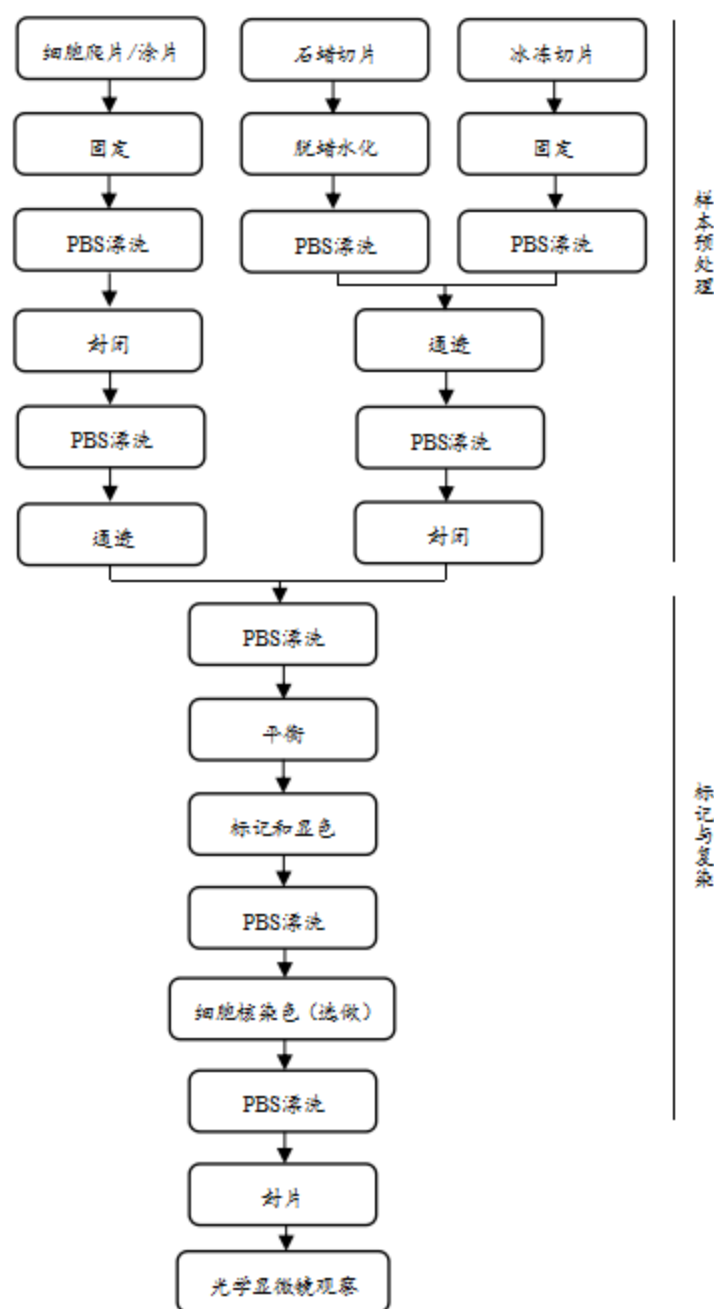
电话: 400-999-2100; 027-87287608

邮箱: sales@procell.com.cn

地址: 湖北省武汉市高新大道858号生物医药产业园三期C4栋



实验流程



自备试剂及仪器

1) 细胞样本

固定液：多聚甲醛用 PBS 稀释至浓度为 4%。

阻断剂： H_2O_2 用去离子水稀释至浓度为 3%。

通透液：Triton X-100 用 PBS 稀释至浓度为 0.2%。该溶液建议提前 1~2 天配制并放在 4°C 保存。

2) 石蜡切片

二甲苯、无水乙醇。

阻断剂： H_2O_2 用去离子水稀释至浓度为 3%。

3) 冰冻切片

固定液：多聚甲醛用 PBS 稀释至浓度为 4%。

阻断剂： H_2O_2 用去离子水稀释至浓度为 3%。

4) 其他试剂

PBS、 ddH_2O 、苏木素、中性树脂。

5) 仪器

光学显微镜。

试剂配制

1) 1×蛋白酶K工作液

取 1 μ L Proteinase K (100×) 加入 99 μ L PBS 中，混匀。现用现配。

2) 1×DNase I Buffer工作液

按照9:1的比例用 ddH_2O 将DNase I Buffer (10×)稀释待用。现用现配。

3) DNase I工作液 (200 U/mL)

用1×DNase I Buffer工作液，按照99:1稀释比将DNase I (20 U/ μ L)稀释待用。现用现配。

注：DNase I 会在剧烈混合下变性，建议不要涡旋 DNase I 溶液。

4) 1×DAB工作液

按照19:1的比例用DAB Dilution Buffer将DAB Concentrate (20×) 稀释待用。现用现配。

固定与通透

1. 细胞样本

1) 细胞爬片：将细胞爬片浸入 PBS 漂洗 1 次，滤纸吸干周围水分，再浸入固定液（自备），室温固定 15~20 min 或 4°C 固定 1~2 h。

细胞涂片：收集细胞，加入一定体积的PBS重悬细胞沉淀，然后加入和PBS等体积的固定液（自备），室温固定15~20 min或4°C固定1~2 h。600×g离心5 min，PBS重悬，取25~50 μ L细胞悬液涂片在载玻片上晾干。



注：细胞固定是TUNEL实验的重要步骤。未固定的细胞可能会丢失较小的DNA片段，导致较低低的信号。

- 2) 固定好的样本浸入PBS漂洗3次，每次5 min。
- 3) 将样本浸入阻断剂（自备）中，室温（15~25°C）封闭10 min。
- 4) 封闭好的样本浸入PBS漂洗3次，每次5 min。
- 5) 将样本浸入通透液（自备）中，37°C作用10 min。
- 6) 将通透好的样本浸入PBS漂洗3次，每次5 min。

2. 石蜡切片

- 1) 用常规方法将切片脱蜡水化。将切片浸入二甲苯（自备）脱蜡2次，每次10 min；无水乙醇（自备）浸泡切片2次，每次5 min；90%、80%、70%的乙醇水溶液（自备）各一次，每次3 min。

注：低温可能影响二甲苯脱蜡效果。当室温低于20°C时，二甲苯脱蜡时间可延长至20 min。

- 2) 脱蜡好的样本浸入PBS漂洗3次，每次5 min。
- 3) 吸干切片组织周围的水分，每个样本上滴加100 μ L 1 \times Proteinase K工作液，37°C反应20 min。
注：不同组织或物种的样本反应时间可能不同，建议进行预实验，确定反应时间。
- 4) 将通透好的样本浸入PBS漂洗3次，每次5 min。
- 5) 吸干切片周围的水分，样本浸入阻断剂（自备）中，室温（15~25°C）封闭10 min。
- 6) 样本浸入PBS漂洗3次，每次5 min。

3. 冰冻切片

- 1) 取出冰冻切片，平衡至室温，再浸入固定液（自备），室温（15~25°C）固定30 min。
- 2) 固定好的样本浸入PBS漂洗3次，每次5 min。
- 3) 每个样本上滴加100 μ L 1 \times Proteinase K工作液，37°C反应10 min。
注：不同组织或物种的样本反应时间可能不同，建议进行预实验，确定反应时间。
- 4) 将通透好的样本浸入PBS漂洗3次，每次5 min。
- 5) 吸干切片周围的水分后，样本浸入阻断剂（自备）中，室温（15~25°C）封闭10 min。
- 6) 样本浸入PBS漂洗3次，每次5 min。

标记和显色

> 预备步骤

1. （可选做）阳性、阴性对照的设置

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。建议在每次实验中设置阳性对照和阴性对照。

注：阴性对照和阳性对照的制备可以同时进行。

1) 阳性对照

- a) 滴加100 μ L 1 \times DNase I Buffer工作液到已通透的样本上，室温平衡5 min。
- b) 用吸水纸去除样本上多余的液体。加入100 μ L稀释后的DNase I工作液（200 U/mL），37°C孵育10~30 min。
- c) 样本浸入PBS漂洗3次，每次5 min。



2) 阴性对照

- 滴加 100 μL 1 \times DNase I Buffer 工作液到已通透的样本上，室温平衡 5 min。
- DNase I Buffer 孵育阴性样本，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10~30 min。
- 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

2. 工作液的配制

1) TdT 酶工作液配制

参考下表配制适当 TdT 酶工作液，充分混匀，现用现配。

	阳性对照/实验	阴性对照
TdT Equilibration Buffer	40 μL	45 μL
Biotin-dUTP	5 μL	5 μL
TdT Enzyme	5 μL	0 μL
TdT 酶工作液总体积	50 μL	50 μL

注：

- TdT Equilibration Buffer 使用前，室温静置直至完全溶解。冰冻的平衡液融化后可能会出现钴盐结晶，此为正常现象。使用前涡旋混匀。
- TdT Enzyme 对温度较敏感，请严格保存于 -5~-20 $^{\circ}\text{C}$ ，使用前取出，使用后立即放回。
- 配制 TdT 酶工作液时，建议不要涡旋。

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，现用现配。

	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

➤ 标记和显色步骤

- 每个样本滴加 100 μL TdT Equilibration Buffer，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10~30 min。
- 吸水纸吸除 TdT Equilibration Buffer（注意不要干片）。每个样本滴加 50 μL TdT 酶工作液，放入湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 60 min。
- 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- 吸水纸吸干水分后滴加 100 μL Streptavidin-HRP 工作液，放入湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 min。
- 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
注：可适当延长洗涤时间或洗涤次数，否则残留的 HRP 会增加染色背景。
- 吸水纸吸干样本周围的水分，滴加 100 μL 的 1 \times 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。
- 显色完成后样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- （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-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. 将中性树脂（自备）滴在组织旁边，并用盖玻片封片，注意避免产生气泡，封好的切片水平置于通风橱中晾干。
11. 光学显微镜下观察、拍照。

常见问题及解决方案

现象	可能原因	建议
非特异性染色	TdT 酶的浓度过高。	用 TdT Equilibration Buffer 以 1:2~1:10 稀释。
	TdT 酶反应时间过长或 TdT 酶反应过程中反应液渗漏，细胞或组织表面不能保持湿润。	注意控制反应时间，并确保 TdT 酶反应液能很好地覆盖样品。
	光照紫外线导致包埋试剂的聚合（如：甲基丙烯酸会导致样本 DNA 的断裂）。	尝试改用其它包埋材料或其它聚合试剂。
	在固定组织时样本 DNA 已断裂（内源核酸酶的作用）。	确保样品取样后立即固定或通过肝静脉灌注固定。
	使用了不适当的固定液，例如一些酸性固定液。	采用推荐的固定液。
	Streptavidin-HRP 工作液未清洗干净。	适当增加漂洗次数与时间。
	固定后某些核酸酶活性依然较高导致 DNA 断裂。	用含有 dUTP 和 dAPT 的溶液封闭。
标记率低	如果以乙醇或甲醇固定的样本则标记效率较低（因为在固定时染色质未能与蛋白质交联，而在操作中丢失）。	用溶于 PBS pH7.4 中的 4%多聚甲醛固定或福尔马林或戊二醛固定。
	固定时间过长，导致交联程度过高。	减少固定时间，或用溶于 PBS pH7.4 的 2%多聚甲醛固定。
	石蜡切片脱蜡不充分。	1. 延长脱蜡时间； 2. 更换新的脱蜡液。
	通透条件不佳，以致于试剂不能到达靶分子或浓度过低。	1. 增加通透时间； 2. 优化蛋白酶 K 的作用浓度和作用时间。
显色背景高	支原体污染。	请使用支原体染色检测试剂盒检测是否为支原体污染。
	TdT 酶的浓度过高或反应时间过长。	用 TdT Equilibration Buffer 以 1:2~1:10 稀释或注意控制反应时间。
	细胞内的过氧化氢封闭不充分会导致很多细胞呈现阳性染色。	改进过氧化氢的封闭方法，延长封闭时间等。



	DAB 显色时间过长。	适当减少 DAB 显色时间。
阳性对照无信号	DNase I 工作液的浓度过低。	增加 DNase I 工作液浓度。
	蛋白酶 K 洗涤不充分。	增加洗涤次数或延长洗涤时间。
	细胞样本中，0.2%Triton X-100 没充分混匀。	提前 1~2 天配制 0.2%Triton X-100。
组织样本脱落	组织样本被酶从载玻片上消化下来。	降低蛋白酶 K 的处理时间。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 洗涤过程应充分洗涤，否则会影响后续实验中酶的活性（如DNase I和TdT酶）。用PBS清洗样本后，请用吸水纸吸干样本周围的液体。
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酶避免反复冻融，建议不要涡旋。
6. 本说明书中推荐的条件是通用的，用户可根据不同的样本类型和预实验的结果，对样本处理时间试剂浓度等条件进行优化，选择最合适的实验条件。

