



## TUNEL 细胞凋亡两步法检测试剂盒-AP (50T)

(TUNEL Apoptosis Detection Kit, AP)

**产品货号:** MK1014

**产品名称:** TUNEL 细胞凋亡两步法检测试剂盒-AP (50T)

**产品批号:** 见外包装标签

**产品保存:** -20°C保存, 一年有效。

<b>产品组成:</b>	1. 标记缓冲液(Labeling Buffer)	3ml
	2. 末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT, ×20)	50μl
	3. BIO-dUTP(×20)	50μl
	4. 封闭液(Blocking Reagent)	10ml
	5. SABC-AP (×100)	50μl
	6. Proteinase K (×200)	125μl
	7. SABC 稀释液	10ml
	8. BCIP/NBT 显色剂(×20)	500ul
	9. 阳性对照片 2 张	

### 用户自备试剂:

1. 多聚赖氨酸或 APES(博士德公司有售)。
2. 0.01M TBS, PH7.5 (AR0031 博士德公司有售)(配法: 1L 双蒸馏水中加入 8.5 克氯化钠, 1.2 克 Tris 和 0.45-0.5ml 纯乙酸)。
3. 0.01M TBS, pH9.0--9.5(配法:1L 双蒸馏水中加入 8.5 克氯化钠, 1.2 克 Tris)。
4. 核固红—复染用(博士德公司有售 AR0008)。
5. 水溶性封片剂(博士德公司有售 AR1018)。

### 工作原理:

在机体内部随时都在发生着细胞的死亡。传统上用显微镜来观察细胞的死亡, 其特征为核染色质的浓缩及碎片的形成。但是这种现象出现的很晚, 时间也很短暂。凋亡的特征是内源性核酸内切酶被激活, 细胞自身的染色质或 DNA 被切割, 出现单链或双链缺口, 并产生与 DNA 断点数目相同的 3'-OH 末端。末端脱氧核糖核酸转移酶 (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) 可以将生物素标记的 dUTP (BIO-dUTP) 标记至 3'-OH 末端, BIO-dUTP 结合在 DNA 断点部位, 再结合链酶亲和素-AP (SABC-AP), BCIP/NBT 予以显示。凋亡的细胞核呈紫蓝色, 从而可以在显微镜下观察到



着色的凋亡细胞。

### 操作步骤:

1. 样品处理
  - (1) 玻片预先用多聚赖氨酸或 APES 进行处理。
  - (2) 细胞涂片和冰冻切片: **最重要的是及时固定。**用 4%多聚甲醛/0.01M PBS(PH7.0---7.6) 室温下固定 30-60 分钟。0.01M PBS 洗 2 分钟×2 次。蒸馏水洗涤 2 分钟×2 次。
  - (3) 组织: **有条件时应及时固定。**常规 4%多聚甲醛/0.01M PBS(PH7.0---7.6)或 10%中性缓冲福尔马林固定 4 小时以上, 石蜡包埋。切片常规脱蜡入水(脱蜡务必干净)。
2. 标本片加 0.01M TBS 1:200 新鲜稀释 Proteinase K 37°C消化 1-15 分钟, 0.01M TBS 洗 2 分钟×3 次。(细胞涂片和冰冻切片一般不消化或消化 10-60 秒钟。新鲜石蜡切片消化 5-10 分钟。陈旧石蜡切片消化 10-15 分钟。)
3. 标本片加标记缓冲液(Labeling Buffer) 20μl/片, 以保持切片湿润。按每张切片取 TdT 和 BIO-d-UTP 各 1μl, 加入 18μl 标记缓冲液中, 混匀。甩去切片上多余液体后加标记液, 20μl/片。置样品于湿盒中, 37°C标记 2 小时。
4. 0.01M TBS 洗 2 分钟×3 次。
5. 加封闭液 50μl/片, 室温 30 分钟, 甩掉封闭液, 不洗。
6. 用 SABC 稀释液 1: 100 稀释 SABC-AP: 取 1ml SABC 稀释液加 SABC 10μl, 混匀后 50μl/片加至切片。37°C反应 60 分钟。0.01M TBS (pH7.5) 洗 5 分钟×4 次。
7. BCIP/NBT 显色: BCIP/NBT (×20) 按 1: 20 的比例用 0.01M TBS (pH9.0-9.5)稀释, 混匀。显色液加至标本上。避光显色 20-30 分钟, 若无背景出现则可继续显色。充分水洗。
8. 必要时可用核固红等复染。水溶性封片剂(博士德有售)封片, 也可简单地用甘油封片。镜检。

### 结果判定:

细胞核中有紫蓝色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡的细胞。

### 注意事项:

1. 试剂盒严格-20°C存放。
2. 初用时如试管底部无可见的试剂, 在离心机离心 5 分钟, 使试剂沉至管底。
3. 检测过程中切勿使样品干涸。
4. BCIP/NBT 显色较慢, 可适当延长显色时间。