



TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-AP (50T)

(TUNEL Apoptosis Detection Kit, AP)

产品货号: MK1017

产品名称: TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-AP (50T)

产品批号: 见外包装标签

产品保存: -20℃保存, 一年有效。

产品组份:

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. DIG-dUTP(×20)	50μl
4. 封闭液(Blocking Reagent)	10ml
5. 生物素化抗地高辛抗体(×100)	50μl
6. SABC-AP(×100)	50μl
7. Proteinase K (×200)	125μl
8. BCIP/NBT 显色剂(×20)	0.5ml
9. SABC 稀释液	10ml
10. 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(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。
5. 水溶性封片剂。

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) 可以将地高辛标记的 dUTP (DIG-dUTP) 标记至 3'-OH 末端, DIG-dUTP 结合在 DNA 断点部位, 可以通过生物素化抗地高辛抗体 (Anti-DIG-Biotin) 和 SABC-AP 反应后, 加入显色底物 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。

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR DIAGNOSTIC AND CLINICAL USE.



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。PBS 洗 2 分钟×2 次。蒸馏水洗涤 2 分钟×2 次。

(3) 组织: 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, 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 DIG-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 稀释生物素化抗地高辛抗体: (取 1ml SABC 稀释液加生物素化抗地高辛抗体 10μl), 混匀后 50μl/片加至标本片上。置样品于湿盒中, 37°C反应 30-60 分钟。0.01M TBS 洗 2 分钟×3 次。

7. 用 SABC 稀释液 1: 100 稀释 SABC-AP: 取 1ml SABC 稀释液加 SABC-AP 10μl, 混匀后 50μl/片加至切片。37°C反应 60 分钟。0.01M TBS 洗 5 分钟×4 次。

8. 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。

9. 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 3 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。