



## TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-FITC+POD (50T)

(TUNEL Apoptosis Detection Kit, FITC+POD)

**产品货号:** MK1019

**产品名称:** TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-FITC+POD (50T)

**产品批号:** 见外包装标签

**产品保存:** -20°C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-FITC(×100)	50μl
7. SABC-POD(×100)	50μl
8. Proteinase K (×200)	125μl
9. SABC 稀释液	10ml
10. 未染色阳性对照片 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. 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) 反应后, 再结合荧光素 FITC 或者过氧化物酶 POD 标记的链酶亲和素 (SABC-FITC/SABC-POD)。FITC 在 490-495nm 激发, 在 520-530nm 发射荧光, 在荧光显微镜下呈明亮黄绿色。POD 的在加入显色底物 DAB 显色后, 凋亡的细胞核呈棕黄色。用户根据实验需要, 在不同切片上用两套不同显示系统观察。



### 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：**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，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 分钟。0.01M TBS 洗 2 分钟×3 次。
7. 用 SABC 稀释液 1：100 稀释 SABC-FITC/（SABC-POD）：取 1ml SABC 稀释液加 SABC-FITC/（SABC-POD）10μl，混匀后 50μl/片加至切片。37°C反应 30 分钟。0.01M TBS 洗 5 分钟×4 次。
8. 加 SABC-FITC 的在荧光显微镜下用蓝色光激发观察。
9. 加 SABC-POD 的，可选用 DAB 显色：取 1ml 蒸馏水，分别加入 DAB 试剂盒中 A，B，C 试剂各一滴，混匀后加至标本片上，显色 10-30 分钟左右。水洗。
10. 苏木素轻度复染。0.01M TBS 洗，蒸馏水洗。水溶性封片剂封片。

### 结果判定:

荧光显微镜下：细胞核中有黄绿色颗粒者为阳性细胞，即凋亡的细胞。

普通显微镜下：细胞核中有棕黄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。