

## TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (HRP-DAB 显色法)

### TUNEL In Situ Apoptosis Kit (HRP-DAB Method)

货号: FNCK105

规格: 20 Assays / 50 Assays / 100 Assays

保存条件: -20℃可保存一年。Streptavidin-HRP 和 DAB Concentrate (20×)需避光保存。

Cat.	products	20 Assays	50 Assays	100 Assays	Storage
FNCK10A	TdT Equilibration Buffer	4 mL	9 mL	9 mL×2	-20℃
FNCK10B	TdT Enzyme	100 μL	250 μL	250 μL×2	-20℃
FNCK10C	Proteinase K (100×)	20 μL	50 μL	100 μL	-20℃
FNCK105D	Streptavidin-HRP	10 μL	25 μL	50 μL	-20℃
FNCK105E	Biotin-dUTP	100 μL	250 μL	500 μL	-20℃
FNCK105F	DAB Concentrate (20×)	200 μL	500 μL	1 mL	-20℃
FNCK105G	DAB Dilution Buffer	4 mL	10 mL	10 mL×2	-20℃
FNCK10E	DNase I (20 U/μL)	5 μL	13 μL	25 μL	-20℃
FNCK10F	DNase I Buffer (10×)	300 μL	700 μL	1500 μL	-20℃

### 产品简介

TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (HRP-DAB 显色法) 是一种高灵敏度且操作简便的细胞凋亡检测方法。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、细胞爬片) 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。

### 自备试剂及仪器

#### 1. 细胞样本

固定液 (4%多聚甲醛溶于 PBS)。

阻断剂 (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶于去离子水)。

通透液 (0.2%的 Triton-100 溶于 PBS)。该溶液建议提前 1 天配制在 4 度保存。

#### 2. 石蜡切片

二甲苯、无水乙醇。

阻断剂（3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶于去离子水）。

### 3. 冰冻切片

固定液（4%多聚甲醛溶于 PBS）。

阻断剂（3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶于去离子水）。

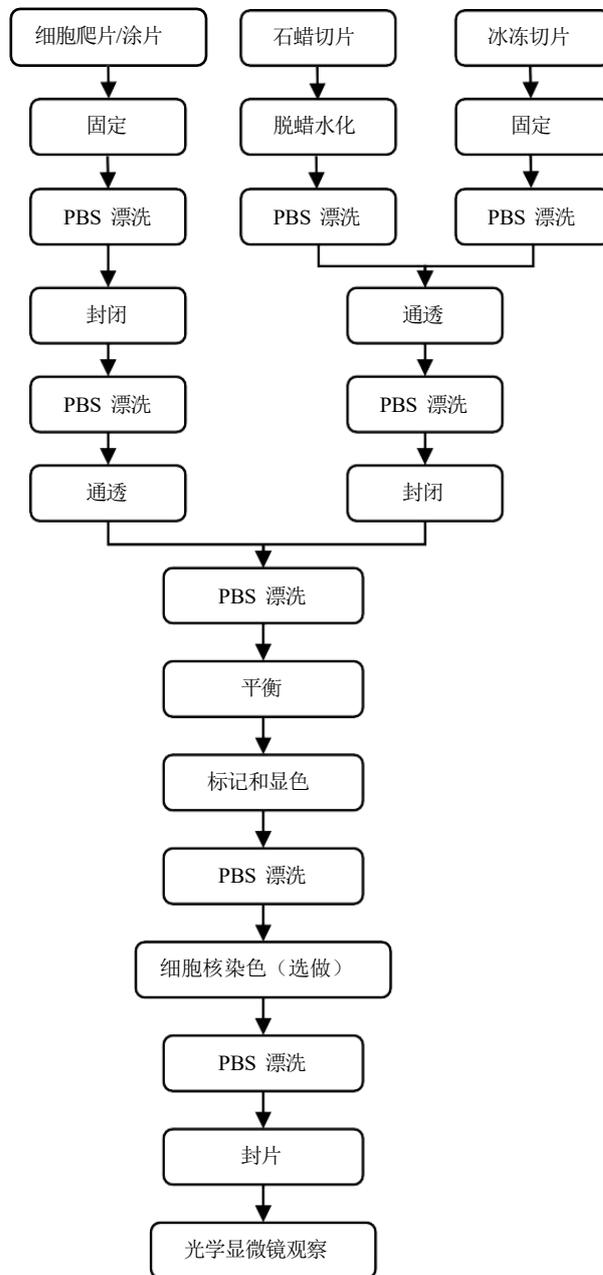
### 4. 其他试剂

PBS、ddH<sub>2</sub>O、苏木素、中性树胶。

### 5. 仪器

光学显微镜。

## 实验流程



## 试剂配制

- 1) 1×蛋白酶 K 工作液：取 1 μL Proteinase K (100×) 加入 99 μL 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<sub>2</sub>O 将 DNase I Buffer (10×) 稀释待用。现配现用。
- 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/μL) 稀释待用。现配现用。  
**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。

## 固定和通透

### 样本处理

#### 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℃ 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℃ 固定 1~2 h。600×g 离心 5 min，PBS 重悬，取 25~50 μL 细胞悬液涂片在载玻片上晾干。
- 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℃ 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℃ 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 μL 1×Proteinase K 工作液，37℃ 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℃）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℃）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 μL 1×Proteinase K 工作液，37℃ 反应 10~20 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后，样本浸入阻断剂（自备）中，室温（15~25℃）封闭 10 min。
- 6) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

## 标记和显色

### 1. 分组设置

阳性对照

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

阴性对照

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

实验组

- 1) 实验组通透完成后在 PBS 中静置，等待阳性对照和阴性对照处理后共同进行标记染色。

### 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。

组分	阳性对照/实验组	阴性对照
TdT Equilibration Buffer	40 $\mu\text{L}$	45 $\mu\text{L}$
Biotin-dUTP	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
TdT Enzyme	5 $\mu\text{L}$	0 $\mu\text{L}$
TdT 酶工作液总体积	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$

注：

1. 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，可在使用前涡旋混匀。
2. TdT Enzyme 对温度较敏感，请严格保存于-20°C，使用前取出，使用后立即放回。
3. 配制 TdT 酶工作液时，建议不要涡旋。
4. 通过在组织切片上倒扣盖玻片的方式（注意防止搓动组织导致样本结构损伤）。

#### 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。

组分	1 个样品	5 个样品	10 个样品
Streptavidin-HRP	0.5 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
PBS	99.5 $\mu\text{L}$	497.5 $\mu\text{L}$	995 $\mu\text{L}$
Streptavidin-HRP 工作液总体积	100 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$

### 3. 标记和显色步骤

- 1) 每个样本滴加 100  $\mu\text{L}$  TdT Equilibration Buffer , 37°C 湿盒中平衡 10~30 min。
- 2) 吸水纸吸除 TdT Equilibration Buffer (注意不要干片)。每个样本滴加 50  $\mu\text{L}$  TdT 酶工作液, 放入湿盒中 37°C 避光反应 60 min。
- 3) 样本浸入 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。
- 4) 吸水纸吸干水分后滴加 100  $\mu\text{L}$  Streptavidin-HRP 工作液, 放入湿盒中 37°C 避光反应 30 min。
- 5) 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。**
- 6) 吸水纸吸干样本周围的水分, 滴加 100  $\mu\text{L}$  的 1×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。**
- 7) 显色完成后样本浸入 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。
- 8) (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, 最后在通风橱中烘干切片。
- 10) 将中性树胶(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。

### 注意事项

1. 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。
2. 实验过程中请保持样本的湿润, 防止干片造成的实验失败。
3. TdT 酶避免反复冻融, 建议不要涡旋。
4. 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。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。