

Elabscience® TUNEL In Situ Apoptosis Kit (HRP-DAB Method)

货号: E-CK-A331

规格: 20 Assays/50 Assays/100 Assays

产品组分

产品编号	产品名称	20 Assays	50 Assays	100 Assays	Storage
E-CK-A32A	TdT Equilibration Buffer	4 mL	9 mL	9 mL×2	-20 °C
E-CK-A32B	TdT Enzyme	100 μL	250 μL	250 μL×2	-20 °C
E-CK-A32C	Proteinase K (100×)	20 μL	50 μL	100 μL	-20 °C
E-CK-A331D	Streptavidin-HRP	10 μL	25 μL	50 μL	-20 °C
E-CK-A331E	Biotin-dUTP	100 μL	250 μL	500 μL	-20 °C
E-CK-A331F	DAB Concentrate (20×)	200 μL	500 μL	1 mL	-20 °C
E-CK-A331G	DAB Dilution Buffer	4 mL	10 mL	10 mL×2	-20 °C
E-CK-A32E	DNase I (20 U/μL)	5 μL	13 μL	25 μL	-20 °C
E-CK-A32F	DNase I Buffer (10×)	300 μL	700 μL	1500 μL	-20 °C
说明书	一份				

产品简介

Elabscience® TUNEL In Situ Apoptosis Kit (HRP-DAB Method), 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)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

石蜡切片 冰冻切片

保存条件

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

自备试剂及仪器

1) 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%。

2) 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%。

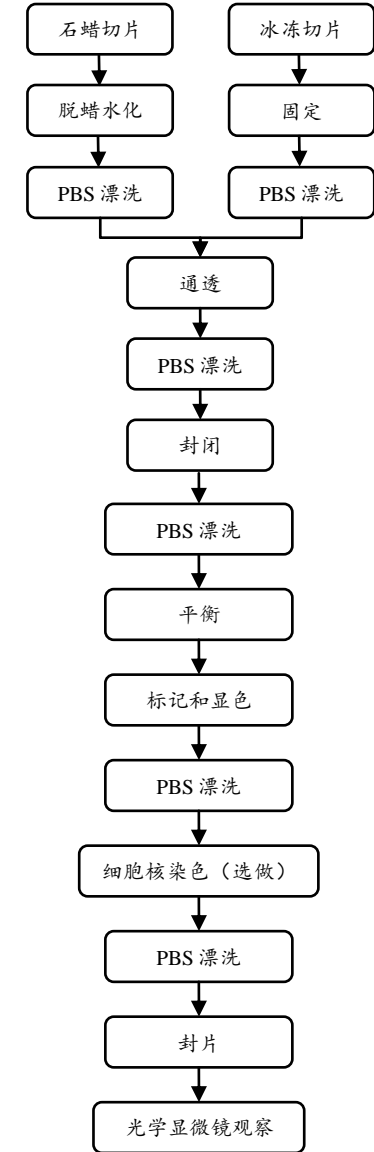
3) 其他试剂

PBS、ddH₂O、苏木素、中性树脂。

4) 仪器

光学显微镜。

实验流程



样本预处理

标记与复染

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 ddH₂O 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/μL) 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. 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。

2. 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

分组	样本选择	特点	目的
阳性对照	任选一张实验组切片	可选做, DNase I 处理切断 DNA, 产生暴露的 3'-OH 末端, 作为阳性样本	验证实验流程和试剂的有效性
阴性对照	任选一张实验组切片	可选做, 标记工作液中不含 TdT 酶	排除样本背景及样本和染色试剂的非特异性染色
实验组	待检测切片样本	必做, 孵育标记工作液, 保持实验检测条件的一致性	实验数据来源

*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。

◇ 阳性对照

- 1) 滴加 100 μL 1×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 μL 稀释后的 DNase I 工作液 (200 U/mL), 37℃ 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 μL 1×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℃ 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。

	阳性对照/实验组	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:

- a) 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。
- b) TdT Enzyme 对温度较敏感, 请严格保存于 -20℃, 使用前取出, 使用后立即放回。
- c) 配制 TdT 酶工作液时, 建议不要涡旋。
- d) 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。

	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

3. 标记和显色步骤

- 每个样本滴加 100 μL TdT Equilibration Buffer, 37℃ 湿盒中平衡 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℃ 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℃ 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×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。
- 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。
- 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。
- 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。
标记率低	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。
	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。
显色背景高	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。
	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。
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

- 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
- 请注意安全事项, 遵守实验室试剂操作规范操作。
- 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。
- 实验过程中请保持样本的湿润, 防止干片造成的实验失败。
- TdT 酶避免反复冻融, 建议不要涡旋。
- 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。