天净沙系列

CAT#:250607-2

低温运输，-20℃保存

天净沙

切片 TUNEL 试剂盒（Biotin-HRP-DAB 法）

FFPE TUNEL Kit（Biotin-HRP-DAB）

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品为基于 TdT 生物素标记和 HRP-DAB 检测的 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒。TUNEL 即 TdT dUTP Nick-End Labeling，其原理是基因组 DNA 断裂时，暴露的 3'-OH 可以在末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)的催化下加上生物素标记的 dUTP，经过 SA-HRP 信号放大和显色后，可以通过显微镜观察调亡细胞。它具有以下特点：

1. 即开即用，用户不需要单独优化实验条件。
2. 高灵敏度，可以在单细胞水平检测到细胞凋亡。
3. 由于细胞一旦凋亡就有 DNA 断裂，故可以检测到早期的细胞凋亡。
4. 基于 TdT 加尾法，更容易标记凋亡细胞而非坏死细胞。
5. 起始材料是冷冻切片或石蜡切片。
6. 本产品足够 20 张切片的 TUNEL 实验。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用 11 孔盒包装

成分	编号	规格	包装
DNase-free 蛋白酶 K 溶液 10 mg/mL	5-P06873-10	10 μL	0.5 mL 红盖管
TUNEL 专用 DNase 溶液	250607-2a	15 μL	0.5 mL 红盖管
5×TdT 反应液	220745b	500 μL	0.5 mL 绿盖管
TdT 酶	220745a	25 μL	0.5 mL 红盖管
TUNEL 底物液	250607-2d	25 μL	0.5 mL 黄盖管
双氧水	CAS7722-84-1	300 μL	1.5 mL 白盖管
100×SA-HRP 浓缩液	28-P22629-hrp	10 μL	0.5 mL 紫盖管
1×DAB 溶解液	220753c-2	1 mL	1.5 mL 本色管
DAB 干粉	CAS7411-49-6	1 mg	1.5 mL 棕色管
DAB 增强剂	220753d	50 μL	0.5 mL 本色管
使用手册	250607sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备物品

PBS，抗荧光淬灭封片液，4%多聚甲醛固定液，二甲苯，乙醇，TX-PBS 溶液（含 0.5% Triton X-100 的 PBS），SSC。

使用流程

一、切片的预处理

1. 如果一次实验要测试 N 张切片，最好准备 N+2 张，多出的两张一张标记为 PC（TUNEL 阳性对照），一张标记为 NC（TUNEL 阴性对照）。

2. 用自选常规方法对石蜡切片进行脱蜡和梯度水化。冷冻切片可跳过此步。
3. 浸入自备 PBS 中，室温放置 5 分钟。冷冻切片从此步开始。
4. 用自备 4%多聚甲醛室温固定 15 分钟。
5. 浸入 PBS 中，室温放置 5 分钟。
6. 将切片取出放平台上，滴加 50 μL 新鲜配制的 DNase-free 蛋白酶 K 工作液，室温孵育 20 分钟。此步处理将通透细胞并暴露细胞核中的 DNA 切口。DNase-free 蛋白酶 K 工作液配制方法是将 10 mg/mL 的 DNase-free 蛋白酶 K 溶液跟 PBS 按 1:500 的体积比混合即可。此溶液现配现用。
7. 浸入 PBS 2 次，每次室温孵育 5 分钟。此步可去除残留的蛋白酶 K。

二、阳性切片的预处理

8. 在标注为 PC 的切片上滴加 45 μL PBS 和 5 μL TUNEL 专用 DNase 溶液，室温放置 10 分钟。由于每次实验（不是每个样本）才需要做一次阳性对照，故本试剂盒提供的 TUNEL 专用 DNase 溶液只够 5 次。
9. 用 PBS 洗涤 PC 切片 3 次，每次 2 分钟。注意：处理 PC 切片需要专门的 Coplin 盒，因为如果混用，处理 PC 切片残留的 DNase 会提高背景，可能产生假阳性。

三、切片的 TdT 标记

10. 在每张切片上滴加 40 μL PBS 和 10 μL 5×TdT 反应液，室温孵育 15 分钟（等待期间可以进行下步的操作）。孵育结束后覆盖液体的处理按第 12 步进行。
11. 在两个微量离心管中按下表新鲜配制两种 TUNEL 标记液。该溶液必须现配现用，没用完的不必保留。N+1 块切片所需量按 N+2 配制：

成分	标记液 1 （用于 NC 切片）	标记液 2 （用于其余切片）
自备超纯水	44 μL	43 μL×(N+2)
TUNEL 底物液	1 μL	1 μL×(N+2)
10×TdT 反应液	5 μL	5 μL×(N+2)
TdT 酶	不加	1 μL×(N+2)

12. 用滤纸放在切片边缘（不要碰触切片）小心吸走第 10 步加入到切片上的液体，吸走后马上加入标记液，盖上塑料盖片使液体均匀分布（不能使用玻璃盖片），然后再如法处理下一张切片。只是在 NC 切片上，需要滴加 50 μL 标记液 1，在其余切片上，需要滴加 50 μL 标记液 2。
13. 将所有放湿盒中 37℃孵育 60 分钟。
14. 移除盖片，将切片放入自备 2×SSC 中浸泡 10 分钟。

15. 用 PBS 洗涤切片 3 次，每次 5 分钟。此步可充分去除未标记底物，避免其对后续反应的干扰。不能缩短。

四、切片的显色

16. 将切片浸入到新鲜配制的双氧水工作液中，室温孵育 5 分钟。双氧水工作液配制方法是将双氧水按 1:100 的体积比加入到 PBS 中混匀即可。
17. 用 PBS 洗涤三次，每次 5 分钟。
18. 在切片上滴加 50 μL 新鲜配制的 SA-HRP 工作液，室温孵育 20 分钟。新鲜配制的SA-HRP工作液配制方法是将试剂盒提供的100×SA-HRP浓缩液按1:100的体积比跟 PBS 混合，轻柔混匀即可。本试剂盒提供的 100×SA-HRP 浓缩液足够配制 1 mL SA-HRP 工作液，足够 20 张切片使用。
19. 用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
20. 新鲜配制 DAB 溶液。在装有 DAB 干粉的棕色管中，加入 1 mL DAB 溶解液，盖上盖子后颠倒 20 次溶解。再按每张切片需要 50 μL DAB 显色液的比例计算所需 DAB 显色液体积，并按下表配制（下表以配制 1 mL 为例，用户如需要配制其他体积，可按比例增减各成分用量）：

成份	加入量
DAB 溶液	990 μL
DAB 增强剂	10 μL
双氧水	1 μL

21. 将 50 μL 上步配制的 DAB 显色液滴加在每张切片上，室温避光放置 10 分钟。
22. 浸在超纯水中数次，空气中干燥后按常规操作封片并在显微镜下检测或照相。

关联产品	切片 TUNEL 试剂盒（DIG-AP-BCIP 法）