

白光 tunel 检查试剂盒 (DAB)

货号: HKI0012

【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
白光 tunel 检查试剂盒 (DAB)	HKI0012	50T/100T	一年

【产品简介】

细胞凋亡中染色体 DNA 的断裂是个渐进的阶段过程。染色体 DNA 首先在内源性的核酸水解酶的作用下降解为 50-300 kb 的大片段, 然后大约 30%的染色体 DNA 在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶作用下, 在核小体单位之间被随机切断, 形成 180-200 bp 核小体 DNA 多聚体。因此在细胞凋亡晚期, DNA 会被降解为 180-200 bp 的片段, 断裂的基因组 DNA 上暴露出大量的 3'-OH 末端。末端脱氧核糖核苷酸转移酶 (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 是一种不依赖于模板的 DNA 聚合酶, 可以催化脱氧核苷酸结合到断裂的 DNA 分子 3'-OH 末端。因此 TUNEL (TdT mediated dUTP Nick End Labeling) 细胞凋亡检测试剂盒可以用来检测组织细胞在凋亡晚期过程中细胞核 DNA 的断裂情况。其原理是在 TdT 酶的作用下, 在基因组 DNA 断裂时暴露出的 3'-OH 末端掺入生物素标记的 dUTP (Biotin-dUTP), 随后用辣根过氧化物酶 (Horse-radish peroxidase, HRP) 标记的链霉亲和素 (Streptavidin) (Streptavidin-HRP, SA-HRP), 检测被生物素 (Biotin) 标记的 DNA 末端, 最后通过加入 HRP 的底物混合液 (DAB) 进行显色反应, 使得凋亡细胞的细胞核被染成棕黄色, 从而可以用普通光学显微镜检测。本试剂盒可适用于石蜡组织切片的细胞凋亡检测。

【储存与运输】

冰袋运输, $-20^{\circ}C$ 储存, 可稳定储存一年。

【试剂组成】

货号	品名	50T	100T
HKI0012-1	白光 Tunel 反应液	2.5ml	5ml
HKI0012-2	TdT 酶	50 μ l	100 μ l
HKI0012-3	Streptavidin-HRP (荧光无)	25 μ l	50 μ l

【使用方法】

石蜡切片荧光 tunel 实验步骤

石蜡切片脱蜡至水: 依次将切片放入二甲苯 I 15min-二甲苯 II 15min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min, 取出置于通风厨内等酒精晾干后放入自来水中稍洗, 蒸馏水洗。(冬天应提高脱蜡温度或适当延长脱蜡时间)

通透: PH6.0 柠檬酸修复液中火修复 8min, 室温冷却, 用免疫组化笔划圈, 之后纯水洗三次(重要)。(通透方式有多种: 1 蛋白酶消化, 2 tritonx100 通透剂通透, 柠檬酸修复)

配试剂工作液以及孵育: 荧光反应液(白光 tunel 反应液)和 TdT 酶按 50:1 比例混合, 此液为 tunel 工作液, 将 tunel 工作液加入到圈内覆盖组织, 切片平放于湿盒内, 37℃ 恒温箱孵育 30min 到 2 小时(具体需要预实验), 湿盒内加少量水保持湿度。

白光 tunel, 按以下操作: HRP 二抗孵育以及 DAB 显色: 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min, 然后 HRP 二抗工作液室温孵育 25min (HRP 二抗工作液, Streptavidin-HRP: PBST=1:1000), ; 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min; DAB 反应液(客户自备)显色; 酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

封片: 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。

镜检拍照: 切片于尼康倒置荧光显微镜下观察并采集图像。(紫外激发波长 330-380nm, 发射波长 420nm; FITC 绿光激发波长 465-495nm, 发射波长 515-555 nm; CY3 红光激发波长 510-560, 发射波长 590nm)

石蜡切片白光 tunel 结果判读 白光 tunel 阳性表达为黄色至棕黑色, 正常细胞为蓝色。

【注意事项】

1. 本试剂仅供科研。
2. 操作时请穿实验服, 佩戴一次性手套。