

一步法TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒，升级装 (红色TRITC标记荧光检测法，通用型)

产品货号：26694

产品规格：20 tests/50 tests/100 tests

产品简介：

一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（TRITC红色荧光标记，通用型）提供一种高灵敏度又快速简便的细胞凋亡检测方法，可检测细胞在凋亡过程中细胞核DNA的断裂情况，其原理是红色荧光素（Tetramethyl rhodamine, TRITC）标记的dUTP在脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT Enzyme）的作用下，可以连接到凋亡细胞中断裂DNA的3'-OH末端，可用荧光显微镜检测。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有DNA的断裂，因而没有3'-OH形成，很少能够被标记。

本试剂盒适用于组织样本（石蜡包埋、冰冻和超薄切片）和细胞样本（细胞涂片或爬片）的凋亡原位检测。对于经过固定和洗涤的细胞或组织，只要经过一步染色反应，洗涤后就可以通过荧光显微镜检测到凋亡细胞。

产品组成：

产品名称	20 tests	50 tests	100 tests	保存条件
10× Proteinase K	200μL	500μL	1.0 mL	-20°C
DNase I (50 U/μL)	200μL	500μL	1.0 mL	-20°C
DNase I Buffer	200μL	500μL	1.0 mL	-20°C
Equilibration Buffer	1.0mL	2.5mL	5.0mL	-20°C
TdT Enzyme	80μL	200μL	400μL	-20°C
Biotin-11-dUTP	20μL	50μL	100μL	-20°C，避光
Streptavidin-TRITC	100μL	250μL	500μL	2-8°C，避光
Labeling Buffer	1.0mL	2.5mL	5.0mL	2-8°C

试剂盒以外自备仪器和试剂：

多聚甲醛、二甲苯、乙醇、1× PBS、H₂O₂、Triton X-100、甲醇、DAPI染液、多聚赖氨酸包被载玻片（细胞样本）、免疫组化笔、盖玻片、染色缸、温盒、量筒等。

操作步骤：

		细胞涂片或冷冻切片	石蜡切片
一	前处理	1. 将自然晾干的细胞样本（细胞涂片或爬片）或冷冻切片浸入4%多聚甲醛固定液的染色缸，室温固定30min。 2. 样本片浸入1× PBS洗3次，每次5min。	1. 石蜡切片脱蜡：60°C烘片60min后，浸二甲苯2次，乙醇水合（100%、95%、80%、75%），每次5min。 2. 切片浸入1× PBS漂洗3次，每次5min。
二	通透	3. 配制1%（v/v）Triton X-100通透液：例如，99mL的1× PBS加入1.0mL Triton X-100，混匀，即用即配。 4. 样本片浸入通透液中，室温促渗5min；之后浸入1× PBS漂洗3次，每次5min。	3. 配制Proteinase K工作液：计算好样本数集中配制，每份90μL 1× PBS加入10μL 10×Proteinase K，即用即配。 4. 切片滴加100μL Proteinase K工作液，37°C反应30min。切片浸入1× PBS漂洗3



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

			次，每次5min（注意：本步骤可选用微波方法：将切片置于pH6.0柠檬酸盐缓冲液中，微波中高火8min后，取出晾凉）。																
三	制阳性片	5. 根据样本类型不同，配制100μL含不同活力单位（U）的DNase I反应液，方法如下（注意：阳性片只针对实验体系进行设置对照，不需要每片制备）：	<table border="1"> <thead> <tr> <th>样本</th> <th>细胞样本</th> <th>冷冻切片</th> <th>石蜡切片</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>U/100μL</td> <td>1000U - 2000U</td> <td>2000U - 3000U</td> <td>3000U - 5000U</td> </tr> <tr> <td>DNase I(50U/μL)用量</td> <td>20μL - 40μL</td> <td>40μL - 60μL</td> <td>60μL - 100μL</td> </tr> <tr> <td>DNase I Buffer用量</td> <td>80μL - 60μL</td> <td>60μL - 40μL</td> <td>40μL - 0μL</td> </tr> </tbody> </table>	样本	细胞样本	冷冻切片	石蜡切片	U/100μL	1000U - 2000U	2000U - 3000U	3000U - 5000U	DNase I(50U/μL)用量	20μL - 40μL	40μL - 60μL	60μL - 100μL	DNase I Buffer用量	80μL - 60μL	60μL - 40μL	40μL - 0μL
样本	细胞样本	冷冻切片	石蜡切片																
U/100μL	1000U - 2000U	2000U - 3000U	3000U - 5000U																
DNase I(50U/μL)用量	20μL - 40μL	40μL - 60μL	60μL - 100μL																
DNase I Buffer用量	80μL - 60μL	60μL - 40μL	40μL - 0μL																
四	连接标记	6. 阳性片滴加100μL上述配制好的DNase I反应液，37°C处理30min。 7. 上述阳性片浸入1×PBS漂洗3次，每次5min。	8. 配制TdT酶反应液：计算好样本数量集中配制（阴性对照片不计入），每个样本用量为：在45μL Equilibration Buffer加入1.0μL biotin-11-dUTP和4.0μL TdT Enzyme，即用即配，注意避光。 9. 样本周围用吸水纸吸干，滴加50μL TdT酶反应液覆盖样本，放入补充足够ddH ₂ O的温盒中，37°C避光反应60min（注：阴性对照样本不加TdT酶反应液）。 10. 反应后的样本片浸入1×PBS漂洗3次，每次5min，注意避光。 11. Streptavidin-TRITC标记工作液制备：每张切片5μL Streptavidin-TRITC与45μL Labeling Buffer混匀，计算所需的总量，即用即配，注意避光。 12. 样本周围用吸水纸吸干，滴加50μL Streptavidin-TRITC标记液覆盖样本，放入湿盒，37°C避光反应30min。 13. 反应后的样本片浸入1×PBS漂洗3次，每次5min，注意避光。 14. 即用型DAPI染色液复染细胞核，室温避光反应10min。洗去DAPI染液，加适量体积比封片剂（可参考以体积比，甘油：PBS = 6 : 4）。																
五	检测	15. 荧光显微镜检测：激发波长543nm，发射波长571nm（注：荧光易淬灭，尽快拍照）。																	

注意事项：

- 各样本请用免疫组化笔做好标记，另外加2张样本切片分别用于阳性片和阴性片制备并做好标记。
- 在每步反应或浸洗的间隙时，配制下一步即用的工作液。
- 反应液最好根据计算好的样本数量集中配制，再分别滴加于各样本上，避免因每个样本单独配制而产生的试剂损耗，TdT酶反应液如需短暂保存时，请置于冰上。
- 操作Streptavidin-TRITC时注意避光。

附：组织样本准备方法

- 石蜡样本：动物经4%多聚甲醛全身灌注后及时取材，样本转移至15mL或50mL密闭离心管中，4%多聚甲醛固定（组织必须完全浸没在固定液中），室温存放24 h以上，可长期保存，常温密封运输，封口膜封好，组织块不易过大过厚，一般2cm × 1.5cm × 0.3cm，尤其是组织块厚度须保持在0.3cm以内（固定液现配使用）。
- 冰冻样本：动物经4%（w/v）多聚甲醛全身灌注后及时取材，4%多聚甲醛固定24 h，30%（w/v）蔗糖脱水48 h以上，-20°C或-80°C冷冻（特殊组织特殊处理：如脑组织，需灌注后取材；眼球需用特殊固定液）。

保存条件：-20°C保存，一年有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

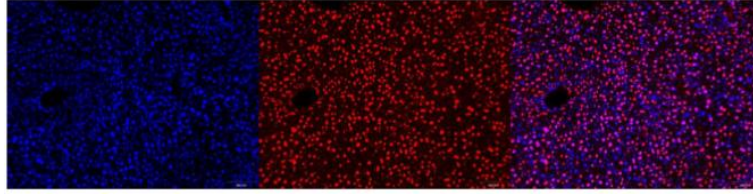
免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

实验范例

C57BL/6小鼠正常肝组织石蜡包埋后切片，二甲苯脱蜡，梯度酒精水化后，利用一步法TUNEL检测试剂盒染色，5000 U/100 μ L DNase I工作液37 $^{\circ}$ C孵育30min，再进行TdT酶连接反应与Streptavidin-TRITC标记，1 μ g/mL DAPI复染细胞核5min。Olympus IX51荧光倒置显微镜20 \times 物镜拍照。（左）蓝色为细胞核；（中）红色为TRITC标记的阳性细胞核；（右）合并视野。



图：小鼠肝组织细胞石蜡切片一步法红光标记TUNEL阳性结果



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com