



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)

产品编号	产品名称	包装
R33077-20T	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	20T
R33077-50T	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	50T

产品简介:

源叶的一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(One Step TUNEL Apoptosis Assay Kit)为您提供了一种高灵敏度又快速简便的细胞凋亡检测方法。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或流式细胞仪检测到呈现绿色荧光的凋亡细胞。

细胞在发生凋亡时,会激活一些 DNA 内切酶,这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA。细胞凋亡时抽提 DNA 进行电泳检测,可以发现 180-200bp 的 DNA ladder。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(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT)的催化下加上绿色荧光探针荧光素(FITC)标记的 dUTP(fluorescein-dUTP),从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测,这就是 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法检测细胞凋亡的原理。注: FITC 是 fluorescein isothiocyanate 的缩写,实际上大多数情况下所谓的 FITC 即为 fluorescein。

本试剂盒有如下优点。(1) 高灵敏度:背景染色极低,阳性染色明亮,可以在单细胞水平检测到细胞凋亡,同时由于凋亡早期就有 DNA 断裂,可以检测到早期的细胞凋亡。(2) 特异性: TUNEL 检测时通常更容易标记凋亡细胞,而不容易标记坏死细胞。(3) 快速:仅需约 1-2 个小时即可完成。(4) 方便:只需一步染色反应,洗涤后即可观察,不必使用二抗等进行多步操作。(5) 应用范围广:可以用于检测冷冻或石蜡切片中的细胞凋亡情况,也可以检测培养的贴壁细胞或悬浮细胞的凋亡情况。(6) 实测效果好:参考图 1,本试剂盒的实际检测效果和国外同类产品相当。

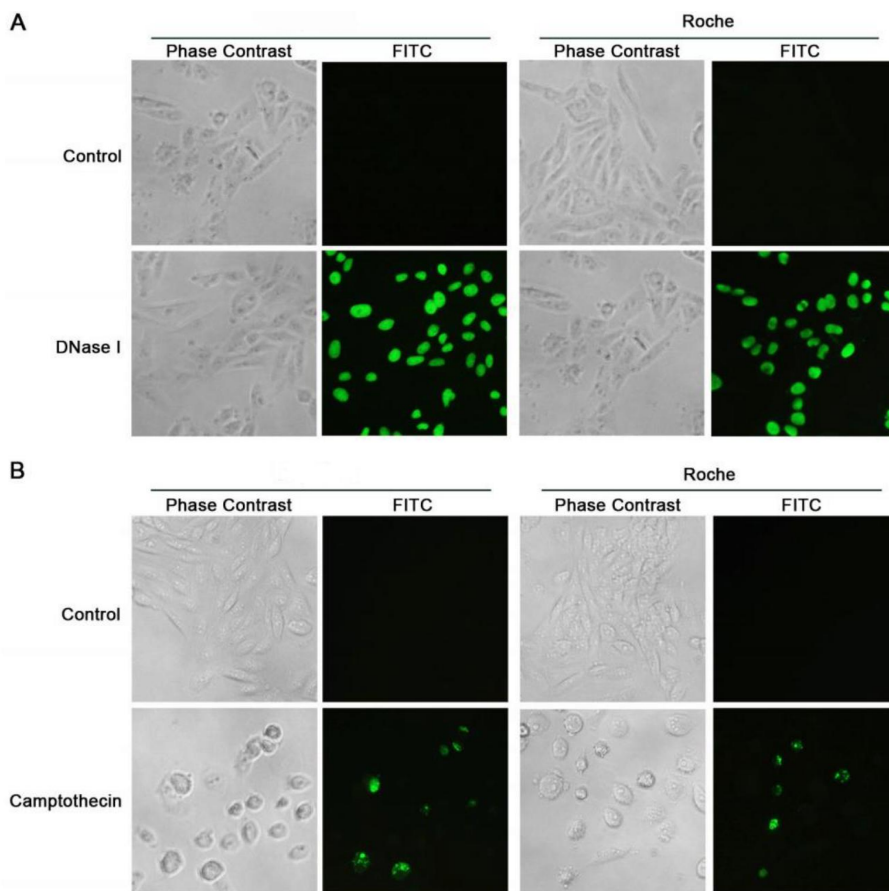


图 1. 本产品的检测效果以及和 Roche 公司同类产品检测效果的比较。A. 本试剂盒和 Roche 公司同类试剂盒分别检测正常 HeLa 细胞和经 DNase I 处理的 HeLa 细胞的效果图，图中的绿色荧光为 TUNEL 染色阳性细胞。B. 本试剂盒和 Roche 公司同类试剂盒分别检测正常 HeLa 细胞和经 10 μM 喜树碱(Camptothecin)处理 24 小时的 HeLa 细胞的效果图。无论是经 DNase I 处理的阳性细胞样品，还是使用 10 μM 喜树碱处理的阳性细胞样品，本试剂盒和 Roche 公司的同类试剂盒的效果相当。本图中的染色实验均在 12 孔板中进行。本图仅作参考，不同的样品不同的检测条件，实际获得的结果可能有较明显的差别。

TUNEL 法特异性检测细胞凋亡时产生的 DNA 断裂，但不会检测出射线等诱导的 DNA 断裂(和细胞凋亡时的断裂方式不同)。这样一方面可以把凋亡和坏死区分开，另一方面也不会把射线等诱导发生 DNA 断裂的非凋亡细胞判断为凋亡细胞。

极少数细胞凋亡时没有 DNA 断裂，此时不适用 TUNEL 法检测。在个别类型的坏死细胞中也发现 TUNEL 检测呈阳性。在需要严格判断细胞凋亡的情况下，最好同时检测多个凋亡指标。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

包装清单:

产品组成	R33077-20T	R33077-50T
TdT Dilution Buffer (选用)	500μl	1.25ml
TdT Enzyme (10x)	100μl	250μl
FITC-12-dUTP Labeling Mix	900μl	1.13ml×2
Proteinase K (2mg/ml)	40μl	100μl
DNase I (0.5mg/ml)	5μl	13μl
10xDNase I Buffer	100μl	250μl
说明书	一份	一份

保存条件:

-20°C 保存。

注意事项:

需自备用于洗涤细胞的 PBS 或 HBSS, 用于封片的抗荧光淬灭封片液, 用于固定的 4%多聚甲醛或免疫染色固定液, 同时需自备含 0.3% Triton X-100 的 PBS 或免疫染色强力通透液。

如果用于石蜡切片的检测, 需自备蛋白酶 K, 二甲苯。

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。

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 对于贴壁细胞或细胞涂片:

- PBS 或 HBSS 洗涤一次。
- 如果细胞贴得不牢, 可以干燥样品使细胞贴得更牢。
- 用免疫染色固定液 或 4%多聚甲醛固定细胞 30 分钟。
- 用 PBS 或 HBSS 洗涤一次。
- 加入免疫染色强力通透液或含 0.3% Triton X-100 的 PBS, 室温孵育 5 分钟。
- 转步骤 5。

2. 对于悬浮细胞或细胞悬液:

- 收集细胞(不超过 200 万细胞), PBS 或 HBSS 洗涤一次。



b. 用免疫染色固定液或 4%多聚甲醛固定细胞 30 分钟。为防止细胞聚集成团, 宜在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动的同时进行固定。

c. 用 PBS 或 HBSS 洗涤一次。

d. 用免疫染色强力通透液或含 0.3% Triton X-100 的 PBS 重悬细胞, 室温孵育 5 分钟。

e. 转步骤 5。

3. 对于石蜡切片:

a. 二甲苯中脱蜡 5-10 分钟。换用新鲜的二甲苯, 再脱蜡 5-10 分钟。无水乙醇 5 分钟。90%乙醇 2 分钟。70%乙醇 2 分钟, 蒸馏水 2 分钟。

b. 滴加 20 μ g/ml 不含 DNase 的蛋白酶 K, 用免疫染色洗涤液或 10mM Tris-HCl pH7.4-7.8 稀释 1000 倍即为 20 μ g/ml 不含 DNase 的蛋白酶 K), 20-37°C 作用 15-30 分钟(不同组织的最佳作用温度和时间需自行摸索)。

c. PBS 或 HBSS 洗涤 3 次。注意: 这一步必须把蛋白酶 K 洗涤干净, 否则会严重干扰后续的标记反应。

d. 转步骤 5。

4. 对于冰冻切片:

a. 用免疫染色固定液或 4%多聚甲醛固定细胞 30-60 分钟。

b. PBS 或 HBSS 洗涤 2 次, 每次 10 分钟。

c. 加入免疫染色强力通透液或含 0.5% Triton X-100 的 PBS, 室温孵育 5 分钟。

d. 转步骤 5。

5. 配制 TUNEL 检测液:

参考下表配制适当量的 TUNEL 检测液, 需充分混匀。注意: 配制好的 TUNEL 检测液必须一次使用完毕, 不能冻存。

	1个样品	5个样品	10个样品
TdT酶	5 μ l	25 μ l	50 μ l
荧光标记液	45 μ l	225 μ l	450 μ l
TUNEL检测液	50 μ l	250 μ l	500 μ l

6. 对于贴壁细胞、细胞涂片或组织切片:

a. 用 PBS 或 HBSS 洗涤 2 次。



b. 在样品上加 50 μ l TUNEL 检测液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 分钟。注意: 50 μ l TUNEL 检测液适合涂片、切片或 96 孔板、48 孔板、24 孔板或 12 孔板的一个孔, 如果是 6 孔板中的一个孔 TUNEL 检测液宜使用 100 μ l。如果待检测的样品为涂片、切片或在 24 孔板、12 孔板或 6 孔板中, 可以使用防蒸发膜, 或自行尝试使用自封袋或者其它适当材料自行裁剪成比孔略小的圆形塑料片, 滴加 TUNEL 检测液后覆盖在样品上, 可以防止 TUNEL 检测液蒸发, 并且使 TUNEL 检测液均匀覆盖样品。自行裁剪圆片时需要连着圆片突出一个角或连着一一条, 并将圆形之外的突出部分折叠, 方便染色结束后利用突出部分顺利取出圆片。也可以用 PAP Pen 圈出一个区域进行染色。孵育时需注意在多余的孔和多孔板的空隙中加入适量水以保持湿润, 从而尽量减少 TUNEL 检测液的蒸发。

c. PBS 或 HBSS 洗涤 3 次。

d. 用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。可以使用的激发波长范围为 450-500nm, 发射波长范围为 515-565nm(绿色荧光)。染色效果可参见图 1。

7. 对于悬浮细胞或细胞悬液:

a. 用 PBS 或 HBSS 洗涤 2 次。

b. 加入 50 μ l TUNEL 检测液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 分钟。

c. PBS 或 HBSS 洗涤 2 次。

d. 用 250-500 μ l PBS 或 HBSS 悬浮。

e. 此时可以用流式细胞仪进行检测或涂片后在荧光显微镜下观察。可以使用的激发波长范围为 450-500nm, 发射波长范围为 515-565nm(绿色荧光)。