



快速一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒 (红色荧光检测法, 通用型)

货号: R41163

储存条件: -20℃

有效期: 12个月

一、产品简介:

快速一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(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KeyFluor555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。由于正常或增殖的细胞几乎没有断裂DNA, 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。

二、产品组成

组分	R41163-20	R41163-50	储存条件
	20 tests	50 tests	
10×Proteinase K	200 μL	500 μL	-20℃
DNase I (50 U/μL)	200 μL	500 μL	
DNase I Buffer	200 μL	500 μL	
TdT Enzyme	100 μL	250 μL	
TUNEL Reaction Buffer (keyFluor555)	1 mL	2.5 mL	-20℃, 避光

三、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、湿盒、量筒等。

四、注意事项

1. 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。

2. 在每步反应或浸洗的间隙时，配制下一步即用的工作液。3. 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。

4. 操作TUNEL Reaction Buffer（keyFluor555）时注意避光。

附：组织样本准备方法

1）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15 mL或50 mL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2 cm×1.5 cm×0.3 cm，尤其是组织块厚度须保持在0.3 cm 以内（固定液现配使用）。

2）冰冻样本：动物经4%多聚甲醛全身灌注后及时取材，4%多聚甲醛固定24 h，30%蔗糖脱水48 h以上，-20℃或-80℃冷冻（特殊组织特殊处理：如脑组织，需灌注后取材；眼球需用FAS固定液）。

五、操作步骤

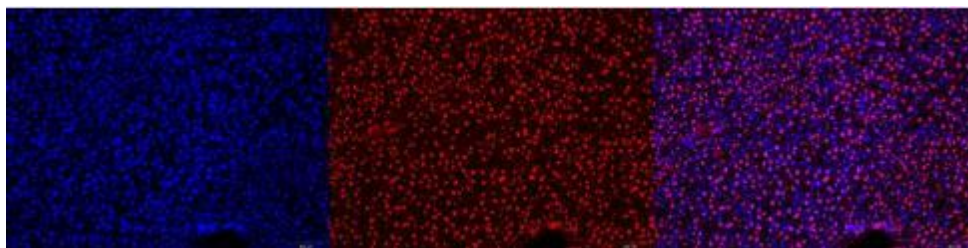
一	前处理	细胞涂片或冷冻切片	石蜡切片
		1. 将自然晾干的细胞样本（细胞涂片或爬片）或冷冻切片浸入盛有4%多聚甲醛固定液的染色缸，室温固定30min； 2. 样本片浸入1×PBS洗3次，每次5min；	1. 石蜡切片脱蜡：烘箱60℃烘片60 min后，二甲苯脱蜡2次，梯度乙醇水合（100%、95%、80%、75%），每次5 min； 2. 切片浸入1×PBS漂洗3次，每次5min；



二	通透	3. 配制1%（v/v）Triton X-100通透液：例如 99 mL的1×PBS加入1 mL Triton X-100，混匀，即用即配； 4. 样本片浸入通透液中，室温促渗5 min；之后浸入1×PBS漂洗3次，每次5min；	3. 配制Proteinase K工作液：计算好样本数量集中配制，每样本90 μL 1×PBS加入10 μL 10× Proteinase K，即用即配； 4. 每个组织切片上滴加100 μL Proteinase K工作液，37℃反应30 min。切片浸入1×PBS漂洗3次，每次5min（注：本步骤可选微波方法：将切片置于pH6.0柠檬酸盐缓冲液中，微波中高火8 min后，取出晾凉）；																							
三	制阳性片	5. 根据样本类型不同，配制100 μL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><tr><td>样本</td><td>细胞样本</td><td>冷冻切片</td><td>石蜡切片</td></tr><tr><td>U/100 μL</td><td>1000-2000 U</td><td>2000-3000 U</td><td>3000-5000 U</td></tr><tr><td>DNase I(50 U/μL)用量</td><td>20-40 μL</td><td>40-60 μL</td><td>60-100 μL</td></tr><tr><td>DNase I Buffer 用量</td><td>80-60 μL</td><td>60-40 μL</td><td>40-0 μL</td></tr></table> 6. 阳性片滴加100 μL上述配制好的DNase I反应液，37℃处理30min， 7. 上述阳性片浸入1×PBS漂洗3次，每次5min；	样本	细胞样本	冷冻切片	石蜡切片	U/100 μL	1000-2000 U	2000-3000 U	3000-5000 U	DNase I(50 U/μL)用量	20-40 μL	40-60 μL	60-100 μL	DNase I Buffer 用量	80-60 μL	60-40 μL	40-0 μL								
样本	细胞样本	冷冻切片	石蜡切片																							
U/100 μL	1000-2000 U	2000-3000 U	3000-5000 U																							
DNase I(50 U/μL)用量	20-40 μL	40-60 μL	60-100 μL																							
DNase I Buffer 用量	80-60 μL	60-40 μL	40-0 μL																							
四	连接标记	8. TUNEL 标记反应，参考下表，配制相应体积的TUNEL检测液。 <table><tr><td></td><td>反应体系/样本</td><td>阴性对照</td><td>阳性对照</td><td>实验组</td></tr><tr><td rowspan="3">TUNEL反应 37℃, 避光, 60 min</td><td>TdT 酶</td><td>0 μL</td><td>5 μL</td><td>5 μL</td></tr><tr><td>TUNEL Reaction Buffer (keyFluor555)</td><td>45 μL</td><td>45 μL</td><td>45 μL</td></tr><tr><td>PBS</td><td>5 μL</td><td>0 μL</td><td>0 μL</td></tr><tr><td colspan="2">检测液总体积</td><td>50 μL</td><td>50 μL</td><td>50 μL</td></tr></table> 注意：配制好的TUNEL检测液必须一次性使用完，不建议冻存后下次再用。 9. 标记结束后，用1×PBS洗涤3次，每次5min。		反应体系/样本	阴性对照	阳性对照	实验组	TUNEL反应 37℃, 避光, 60 min	TdT 酶	0 μL	5 μL	5 μL	TUNEL Reaction Buffer (keyFluor555)	45 μL	45 μL	45 μL	PBS	5 μL	0 μL	0 μL	检测液总体积		50 μL	50 μL	50 μL	
	反应体系/样本	阴性对照	阳性对照	实验组																						
TUNEL反应 37℃, 避光, 60 min	TdT 酶	0 μL	5 μL	5 μL																						
	TUNEL Reaction Buffer (keyFluor555)	45 μL	45 μL	45 μL																						
	PBS	5 μL	0 μL	0 μL																						
检测液总体积		50 μL	50 μL	50 μL																						
五	检测	10. 加入抗荧光淬灭封片液封片后，在荧光显微镜下观察荧光效果，KeyFluor555的激发波长为555 nm，发射波长为570nm（红色荧光，荧光易淬灭，请尽快观察拍照）。																								

六、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，利用凯基快速一步法TUNEL检测试剂盒染色，4000 U/100 μ L DNase I工作液37°C孵育30 min，再进行TdT酶连接反应与Streptavidin-TRITC标记，1 μ g/mL DAPI复染细胞核5 min。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快速一步法红光标记TUNEL阳性结果