

一步法Tunel细胞凋亡检测试剂盒（显色法）

20T WLA029a 50T WLA029b

仅用于科学研究,不能用于诊断



产品信息

产品名称 一步法Tunel细胞凋亡检测试剂盒（显色法）

产品概述 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FITC标记的dUTP，之后经过POD转换试剂将信号转化成显色反应，方便结果的分析与保存。

Tunel细胞凋亡检测试剂盒不依赖生物素系统进行末端标记，避免了内源性生物素产生的高背景等问题。

包装信息

| 试剂名称 | WLA029a (20T) | WLA029b (50T) | 保存条件 |
|----------------------|---------------|---------------|-----------|
| 50xproteinase K (选用) | 100μl | 250μl | -20°C |
| 10xEnzyme Reagent | 100μl | 250μl | -20°C |
| 1xLabeling Substrate | 900μl | 2250μl | -20°C, 避光 |
| 10xPOD Reagent | 100μl | 250μl | -20°C |
| 10xDNase I | 100μl | 250μl | -20°C |
| 1×DNase I Buffer | 900μl | 2250μl | -20°C |
| 20×DAB Reagent A | 50μl | 125μl | -20°C, 避光 |
| 20×DAB Reagent B | 50μl | 125μl | -20°C, 避光 |

操作流程

1. A. 对于贴壁细胞：（最好用细胞爬片）
 - a. 接种于24/48/96孔板的细胞用PBS漂洗5min。
 - b. 预冷的4%多聚甲醛于4°C固定细胞30-60min。
 - c. PBS漂洗细胞3次，每次5min。
 - d. 加入含0.1%-0.2% Triton X-100的PBS（现用现配），冰浴2-5min。
 - e. 转至步骤2。
1. B. 对于悬浮细胞：
 - a. 收集 $0.5-2 \times 10^6$ 个细胞，PBS漂洗一次，1000rpm离心5min。
 - b. 预冷的4%多聚甲醛于4°C固定细胞30-60min。
 - c. PBS漂洗一次，1000rpm离心5min。
 - d. 加入含0.1%-0.2% Triton X-100的PBS（现用现配），冰浴2-5min。
 - e. 转至步骤2。
1. C. 对于石蜡切片：
 - a. 脱蜡，组织切片置于60°C恒温箱，烤片30-60min，浸入装有新鲜二甲苯的染色缸，室温放置15min。浸入另一个装有新鲜二甲苯的染色缸，重复一次。
 - b. 洗涤，组织切片浸入100%乙醇染色缸，室温放置10min。浸入另一个100%乙醇染色缸，重复一次。
 - c. 水化，组织切片浸入梯度浓度乙醇溶液（90%，80%，70%，50%），室温下每步放置3min。
 - d. 组织切片浸入PBS，室温放置5min。
 - e. 组织切片用柠檬酸缓冲液（PH=6.2）进行中火修复5min。（对于有些组织可以用1xProteinase K进行

一步法Tunel细胞凋亡检测试剂盒（显色法）

Wanleibio



20T WLA029a 50T WLA029b

仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

通透,即每个组织滴加50 μ l用PBS稀释的1 \times Proteinase K,室温静置15-30min,具体通透时间因组织而异,需要自行摸索)

表1. 准备用于通透的1 \times Proteinase K缓冲液

| 1 \times Proteinase K | 50 μ l反应中所需体积 | 反应数 | 总体积 |
|--------------------------|-------------------|-----|-----------|
| 50 \times Proteinase K | 5 μ l | x | = μ l |
| PBS | 45 μ l | x | = μ l |

f. 组织切片浸入PBS,室温放置5min,重复漂洗3次,如果用Proteinase K通透则必须彻底去除残留Proteinase K,否则影响后续实验结果。

g. 转至步骤2。

1. D. 对于冰冻切片:

a. 预冷的4%多聚甲醛于4 $^{\circ}$ C固定切片30-60min。

b. 组织切片浸入PBS,室温放置5min,重复漂洗2次。

c. 组织切片用柠檬酸缓冲液 (PH=6.2) 进行中火修复5min。

d. 组织切片浸入PBS,室温放置5min,重复漂洗3次,如果用Proteinase K通透则必须彻底去除残留Proteinase K,否则影响后续实验结果。

e. 转至步骤2。

2. 每个组织或细胞样本滴加50 μ l 3% H_2O_2 ,室温避光静置10min。

表2. 准备用于封闭的3% H_2O_2 缓冲液

| 3% H_2O_2 | 50 μ l反应中所需体积 | 反应数 | 总体积 |
|--------------|-------------------|-----|-----------|
| 30% H_2O_2 | 5 μ l | x | = μ l |
| 甲醇 | 45 μ l | x | = μ l |

3. 组织切片或细胞浸入PBS,室温避光放置5min,重复漂洗2次。

4. 阳性对照 (选做): 阳性对照的组织滴加50 μ l阳性对照缓冲液 (24孔板每孔大概需要100-150 μ l),室温静置10min,浸入PBS,室温放置5min,重复漂洗3次。

表3. 准备用于实验的阳性对照缓冲液

| 阳性对照缓冲液 | 50 μ l反应中所需体积 | 阳性对照数 | 总体积 |
|---------------------------|-------------------|-------|-----------|
| 10 \times DNase I | 5 μ l | x | = μ l |
| 1 \times DNase I Buffer | 45 μ l | x | = μ l |

注: 为避免交叉污染,阳性对照组请用单独的染色缸漂洗!

5. 每个组织滴加50 μ l Tunel反应缓冲液 (24孔板每孔大概需要100-150 μ l), 37 $^{\circ}$ C, 避光孵育60-90min。

表4. 准备用于实验的Tunel反应缓冲液

| Tunel反应缓冲液 | 50 μ l反应中所需体积 | 阳性对照数 | 总体积 |
|-------------------------------|-----------------------|-------|-----------|
| 10 \times Enzyme Reagent | 5 μ l-7 μ l | x | = μ l |
| 1 \times Labeling Substrate | 43 μ l-45 μ l | x | = μ l |

一步法Tunel细胞凋亡检测试剂盒（显色法）



20T WLA029a 50T WLA029b

仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

6. 阴性对照（选做）：用于进行阴性对照的组织或细胞滴加不含10×Enzyme Reagent的Tunel反应缓冲液（45μl 1×Labeling Substrate与5μl去离子水混合），37°C，避光孵育60-90min。
7. 组织切片或细胞浸入PBS，室温放置5min，重复漂洗3次。
8. 每个组织滴加50μl POD转换缓冲液（24孔板每孔大概需要100-150μl），37°C，孵育30min。

表5. 准备用于封闭的POD转换缓冲液

| POD转换缓冲液 | 50μl反应中所需体积 | 反应数 | 总体积 |
|----------------|-------------|-----|------|
| 10xPOD Reagent | 5μl | x | = μl |
| PBS | 45μl | x | = μl |

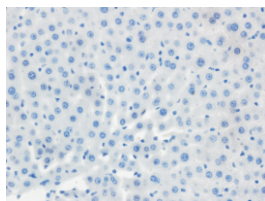
9. 组织切片或细胞浸入PBS，室温放置5min，重复漂洗3次。
10. 每个组织或细胞样本滴加50μl DAB显色剂（24孔板每孔大概需要100-150μl），室温孵育2-5min，根据实际显色情况自行摸索显色时间。

表6. 准备用于实验的DAB显色剂

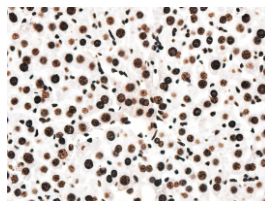
| DAB显色剂 | 50μl反应中所需体积 | 反应数 | 总体积 |
|------------------|-------------|-----|------|
| 20×DAB Reagent A | 2.5μl | x | = μl |
| 20×DAB Reagent B | 2.5μl | x | = μl |
| PBS | 45μl | x | = μl |

11. 复染细胞核：用苏木素复染细胞核（组织染色1min，细胞染色数秒）。
12. A. 对于贴壁细胞或细胞涂片。
蒸馏水返蓝后用50%甘油封片，随即进行显微镜观察。
12. B. 对于切片：
用1%盐酸酒精分化数秒，自来水返蓝。之后进行以下步骤：
 - a. 脱水，组织切片浸入梯度浓度乙醇溶液（50%，70%，80%，90%），室温下每步放置3min。
 - b. 洗涤，组织切片浸入100%乙醇染色缸，室温放置10min。浸入另一个100%乙醇染色缸，重复一次。
 - c. 透明，组织切片浸入装有新鲜二甲苯的染色缸，室温放置15min。浸入另一个装有新鲜二甲苯的染色缸，重复一次。
 - d. 中性树脂封片，通风橱内晾干，置于显微镜下观察。

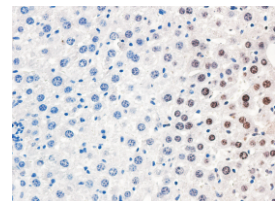
产品图片



阴性对照



阳性对照



大鼠脓毒症肝Tunel检测