一步法Tunel细胞凋亡检测试剂盒(荧光法-红光)

20T **WLA127a** 50T **WLA127b**

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（荧光法-红光）

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）的催化下加上红色荧光探针标记的dUTP，从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪检测到呈现红色荧光的凋亡细胞。

本试剂盒有如下优点：高灵敏度，可以检测到早期的细胞凋亡；特异性好，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；快速，仅需约1-2个小时即可完成；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；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。

包装信息

试剂名称	WLA127a（20T）	WLA127b（50T）	保存条件
50×Proteinase K（选用）	100μl	250μl	-20℃
10×Enzyme Reagent	100μl	250μl	-20℃
1×Labeling Substrate	900μl	2250μl	-20℃，避光
10xDNase I	100μl	250μl	-20℃
1×DNase I Buffer	900μl	2250μl	-20℃

操作流程

1. A. 对于贴壁细胞：

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℃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0.5-2×10^6个细胞，PBS漂洗一次，1000rpm离心5min。

b. 预冷的4%多聚甲醛于4℃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℃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

通透，即每个组织滴加50μl用PBS稀释的1×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×Proteinase K缓冲液

1×Proteinase K	50μl反应中所需体积	反应数		总体积
50×Proteinase K	1μl	x	=	μl
PBS	49μl	x	=	μl

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℃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50ul 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	50μl反应中所需体积	反应数		总体积
30% H_2O_2	5μl	x	=	μl
甲醇	45μl	x	=	μl

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50μl阳性对照缓冲液（24孔板每孔大概需要100-150μl），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	50μl反应中所需体积	阳性对照数		总体积
10×DNase I	5μl	x	=	μl
1×DNase I buffer	45μl	x	=	μl

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50μl Tunel反应缓冲液（24孔板每孔大概需要100-150μl），37℃，避光孵育60-90min。

产品信息

表4. 准备用于实验的Tunel反应缓冲液

Tunel反应缓冲液	50μl反应中所需体积		反应数		总体积
10×Enzyme Reagent	5μl	x		=	μl
1×Labeling Substrate	45μl	x		=	μl

注：此步骤之后直至荧光观察前的所有实验步骤均需避光进行。

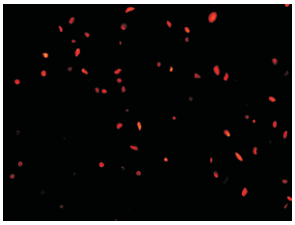
6. 阴性对照（选做）：用于进行阴性对照的组织或细胞滴加不含10×Enzyme Reagent 的Tunel反应缓冲液（45μl 1×Labeling Substrate与5μl去离子水混合），37℃，避光孵育60-90min。

7. 组织切片或细胞浸入PBS，室温放置5min，重复漂洗3次。

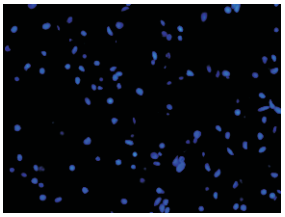
8. 荧光显微镜观察：组织或细胞用DAPI复染细胞核5min，用抗荧光淬灭剂封片，马上进行观察，或存入-20℃，一周之内进行观察。荧光显微镜下用488nm波长激发，阳性细胞核呈红色荧光。

产品图片

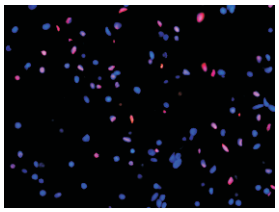
1.Rat brain tissue



553nm激发波长观察



358nm激发波长观察



合并图