

# 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
50×Proteinase K (选用)	100μl	250μl	-20°C
10×Enzyme Reagent	100μl	250μl	-20°C
1×Labeling Substrate	900μl	2250μl	-20°C, 避光
10×POD Reagent	100μl	250μl	-20°C
10×DNase 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)

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	5μl	x	= μl
PBS	45μl	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°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50μl 3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，室温避光静置10min。

表2. 准备用于封闭的3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>缓冲液

3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50μl反应中所需体积	反应数	总体积
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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
10xDNase 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°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	50μl反应中所需体积	阳性对照数	总体积
10xEnzyme Reagent	5μl-7μl	x	= μl
1xLabeling Substrate	43μl-45μl	x	= μl

# 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℃，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℃，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

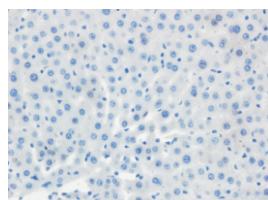
9. 组织切片或细胞浸入PBS，室温放置5min，重复漂洗3次。
10. 每个组织或细胞样本滴加50μl DAB显色剂（24孔板每孔大概需要100-150μl），室温孵育2-5min，根据实际显色情况自行摸索显色时间。

表6. 准备用于实验的DAB显色剂

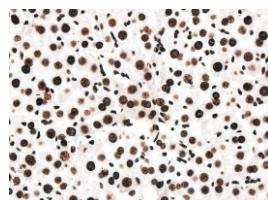
DAB显色剂	50μl反应中所需体积	反应数	总体积
20×DAB Reagent A	2.5μl	x	= μl
20×DAB Reagent B	2.5μl	x	= μl
PBS	45μl	x	= μl

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. 中性树胶封片，通风橱内晾干，置于显微镜下观察。

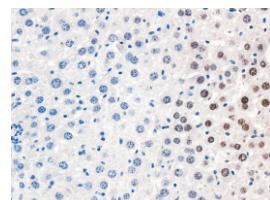
## 产品图片



阴性对照



阳性对照



大鼠脓毒症肝Tunel检测