

TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒 (显色法)

产品货号: 26848

产品规格: 20T/50T

产品简介:

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。

试剂盒组成:

产品名称	20T	50T	保存条件
50×proteinase K (选用)	100ul	250ul	-20℃, 避光
10×Enzyme Reagent	100ul	250ul	-20℃
1×Labeling Substrate	900ul	2250ul	-20℃
10×POD Reagent	100ul	250ul	-20℃
10×DNase I	100ul	250ul	-20℃
1×DNase I Buffer	900ul	2250ul	-20℃
20×DAB Reagent A	50ul	125ul	-20℃, 避光
20×DAB Reagent B	50ul	125ul	-20℃, 避光

使用参考:

A. 对于贴壁细胞 (最好用细胞爬片):

- 接种于24/48/96孔板的细胞用PBS漂洗5min。
- 预冷的4%多聚甲醛于4℃固定细胞30-60min。
- PBS漂洗细胞3次, 每次5min。
- 加入含0.1%-0.2% Triton X-100的PBS (现用现配), 冰浴2-5min。
- 转至步骤2。

B. 对于悬浮细胞:

- 收集 $0.5-2 \times 10^6$ 个细胞, PBS漂洗一次, 1000rpm离心5min。
- 预冷的4%多聚甲醛于4℃固定细胞30-60min。
- PBS漂洗一次。
- 加入含0.1%-0.2% Triton X-100的PBS (现用现配), 冰浴2-5min。
- 转至步骤2。

C. 对于石蜡切片:

- 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。
- 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。
- 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。
- 组织切片浸入PBS, 室温放置5min。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

- 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1×Proteinase 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	50ul反应中所需体积	反应数	总体积
50×Proteinase K	5ul	×	= ul
PBS	45ul	×	= ul

- 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。

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。
 1. 每个组织或细胞样本滴加50ul 3% , 室温避光静置10min。

表2. 准备用于封闭的3% H2O2缓冲液

3% H2O2	50ul反应中所需体积	反应数	总体积
30% H2O2	5ul	×	= ul
甲醇	45ul	×	= ul

2. 组织切片或细胞浸入PBS室温避光放置5min重复漂洗2次。
 3. 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	50ul反应中所需体积	阳性对照数	总体积
10×DNase I	5ul	×	= ul
1×DNase I Buffer	45ul	×	= ul

注: 为避免交叉污染, 阳性对照组请用单独的染色缸漂洗!

4. 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	50ul反应中所需体积	阳性对照数	总体积
10×Enzyme Reagent	5-7ul	×	= ul
1×Labeling Substrate	43-45ul	×	= ul

5. 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。
 6. 组织切片或细胞浸入PBS, 室温放置5min, 重复漂洗3次。
 7. 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	50ul反应中所需体积	阳性对照数	总体积
10×POD Reagent	5ul	×	= ul



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

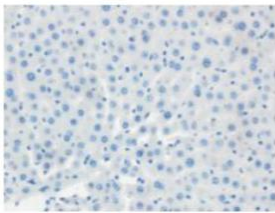
PBS	45ul	×	=	ul
-----	------	---	---	----

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

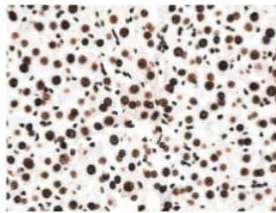
表6. 准备用于实验的DAB显色剂

DAB显色剂	50ul反应中所需体积		阳性对照数	总体积
20×DAB Reagent A	2.5ul	×	=	ul
20×DAB Reagent B	2.5ul	×	=	ul
PBS	45ul	×	=	ul

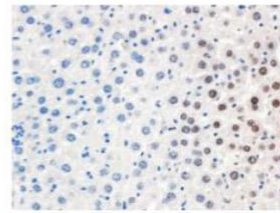
10. 复染细胞核：用苏木素复染细胞核，（组织染色1min，细胞染色数秒）。
11. A. 对于贴壁细胞或细胞涂片：蒸馏水返蓝后，用50%甘油封片，随即进行显微镜观察。
B. 对于切片：用1%盐酸酒精分化数秒，自来水返蓝。之后进行一下步骤。
 - a. 脱水，组织切片浸入梯度浓度乙醇溶液（50%，70%，80%，90%），室温下每步放置3min。
 - b. 洗涤，组织切片浸入100%乙醇染色缸，室温放置10min。浸入另一个100%乙醇染色缸，重复一次。
 - c. 透明，组织切片浸入装有新鲜二甲苯的染色缸，室温放置15min。浸入另一个装有新鲜二甲苯的染色缸，重复一次。
 - d. 中性树胶封片，通风橱内晾干，置于显微镜下观察。



阴性对照



阳性对照



大鼠脓毒症肝 Tunel 检测



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com