GenXion

产品手册

Product Manual

服务热线:400-6169-114 020-84224925 网站:www.genesion.com.cn Email:whiga22@126.com

一步法 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒（绿色，AF488）

货号：JXF60162
规格：50Test
价格：1500元

产品编号	产品名称	50Test	Storage
JXF6016A	平衡液（1 ×）	9 mL	-20° C
JXF6016B	TdT 酶	250 μL	-20° C
JXF6016C	蛋白酶 K（100 ×）	50 μL	-20° C
JXF6016D	荧光标记液	100 μL× 5	-20° C
JXF6016E	DNase I（2 U/μL）	13 μL	-20° C
JXF6016F	DNase I Buffer（10 ×）	250 μL	-20° C
说明书	一份		

产品简介

GenXion® 一步法 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒是一种高灵敏度且快速简便的细胞凋亡检测方法。本试剂盒适用于组织样本(石蜡切片、冰冻切片)和细胞样本(细胞涂片、爬片)的原位凋亡检测。检测结果可通过荧光显微镜直接观察。

检测原理

细胞在发生凋亡时，会激活一些特异性的 DNA 内切酶，这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA。对这些 DNA 进行纯化和电泳检测，可以发现 180-200bp 的 DNA ladder。断裂 DNA 暴露的 3'-OH 可以在末端脱氧核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT)的催化下加上荧光素等小分子标记的 dUTP，从而可以通过光学显微镜或者流式细胞仪进行检测。

自备试剂

1、细胞样本

固定液（4%多聚甲醛）

通透液（0.2%的Triton-100）

2、石蜡切片

二甲苯、乙醇、PBS

3、冰冻切片

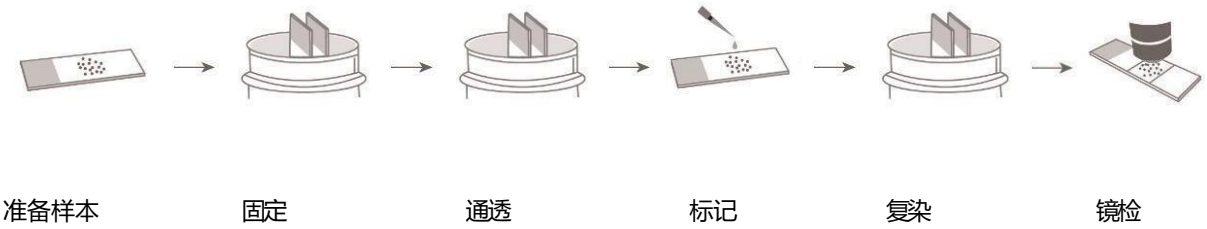
固定液（4%多聚甲醛）

通透液（0.2%的Triton-100）

4、**其他试剂**

PBS、ddH_2O、DAPI、含抗荧光淬灭剂的封片液

操作步骤



1. 固定和通透

A 细胞样本

①.将自然晾干的细胞爬片或涂片浸入固定液，4° C 固定25 min。

②.固定好的样本浸入PBS 漂洗3 次，每次 5 min。

③.配制0.2%的Triton X-100 通透液：将 0.2 mL Triton X-100 加入99.8 mL PBS 中混匀，现配现用。

④.样本浸入通透液中，室温作用 5 min。

⑤.将通透好的样本浸入PBS 漂洗3 次，每次 5 min。

B 冰冻切片

①.将自然晾干的冰冻切片浸入固定液，室温固定30 min。

②.固定好的样本浸入PBS 漂洗2 次，每次 5 min。

③.配制1× 蛋白酶K 工作液：1 μL 100 × 蛋白酶 K加入到 99 μL PBS 中， 混匀。

④.每个样本上滴加 50 μL 1 × 蛋白酶K 工作液，室温反应 10 min。

⑤.将通透好的样本浸入PBS 漂洗3 次，每次 5 min。

C 石蜡切片

按常规方法将石蜡切片进行脱蜡水化：二甲苯脱蜡 2 次，每次 10 min；无水乙醇浸泡切片 2 次，每次5min；90%、80%、70%的乙醇水溶液各一次，每次 3 min。

①.固定好的样本浸入PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

②.配制1 × 蛋白酶 K 工作液：1 μL 100 × 蛋白酶 K加入到 99 μL PBS 中，混匀。

③.每个样本上滴加 50 μL 1 × 蛋白酶K 工作液，室温反应 20 min。

④.将通透好的样本浸入PBS 漂洗3 次，每次 5 min。

2.阳性及阴性对照的准备

TUNEL 检测时需设置阳性和阴性对照，以显示实验的客观性及准确性。因此需按照下述方法准备阳性和阴性样本的操作，其余步骤与待测样本同样进行。实验组样本直接进入下列步骤 3

A 阳性对照

按照1:10 的比例用ddH2O 将DNase I Buffer (10 ×)稀释成 1 × DNase I Buffer 工作液备用。

1.滴加100 μL 1 × DNase I Buffer 工作液到已通透的样本上，室温平衡5 min。

2.用1 × DNase I Buffer 工作液，按照 1:100 稀释比将DNase I (2 U/μL) 稀释成DNase I 工作液（20 U/mL）。

3.去除样本上多余的液体，加入100 μL 稀释后的DNase I 工作液（20 U/mL），室温孵育10~30 min。

4.样本浸入PBS 漂洗3 次，每次5 min。

B 阴性对照

阴性对照组直接进入下列步骤 3，但标记反应不添加 TdT 酶，其余步骤均相同。

3.标记和复染

1）配制 TdT 酶反应液：计算好样本量集中配置（阴性对照不计入），每个样本用量为：在 35 μL 平衡液(1 ×) [JXF6016A]中加入 10 μL 荧光标记液[JXF6016D]和 5 μL TdT 酶[JXF6016B]，充分混匀，现配现用。

注：冰冻的平衡液融化后可能会出现钴盐结晶，此为正常现象，使用前混匀即可。

2）每个样本滴加 100 μL 平衡液(1 ×) [JXF6016A]，室温平衡 10~30 min。

3）吸水纸吸除平衡液，每个样本滴加 50 μL TdT 酶工作液，加盖玻片放入湿盒中，37° C 避光反应 60 min（阴性对照样本不加 TdT 酶）。

4）样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

5）吸水纸吸干水分后滴加 DAPI，室温避光孵育 5 min，对细胞核进行复染。

6）样本浸入 PBS 漂洗 4 次，每次 5 min。

7）用吸水纸吸干多余的液体，用含抗荧光淬灭剂的封片剂封片。

4.镜检

荧光显微镜下观察，AF488 最大激发波长为 495 nm，最大发射波长为 519 nm（绿色荧光）。

保存条件

-20° C 可保存一年。荧光标记液[JXF6016D]需避光保存。

注意事项

1.荧光标记液和 TdT 酶避免反复冻融，使用前离心涡旋混匀。
2.PBS 清洗样本后，请尽量除去 PBS 溶液后再进行下一步操作。
3.实验过程中请保持样本的湿润，防止干片造成的实验失败。
4.本说明书中推荐的条件是通用的，用户需要根据自己的样本和预实验的结果，对处理时间、浓度等条件进行优化，选择最合适的实验条件。
5.本产品仅限于专业人员的科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
6.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。