



信天翁生物科技（广州）有限公司

电话：400-090-1923

网址：www.gooniebio.com

GF555 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(橙红色荧光)

产品编号	产品名称	产品包装
100-132	GF555 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(橙红色荧光)	20 次

产品简介

GF555 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒是用来检测组织细胞在凋亡过程中基因组 DNA 的断裂情况，其原理是荧光染料标记的 dUTP(555-dUTP)在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT Enzyme)的催化下连接到断裂 DNA 的 3'-OH 末端，从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测。本试剂盒适用于组织样本(石蜡切片和冰冻切片)和细胞样本(贴壁细胞和悬浮细胞)的凋亡情况检测。

试剂盒组分

试剂	浓度	试剂量
DNase I	20X	30 μ L
10 $\times$ DNase I Buffer	10X	120 μ L
TdT Enzyme	50X	21 μ L
5 $\times$ Equilibration Buffer	5X	220 μ L
555-dUTP	10X	105 μ L
Hoechst33342	500X	22 μ L

运输与保存

干冰运输，-20 $^{\circ}$ C 储存，荧光试剂需避光保存，一年有效。

自备试剂

10mM PBS, pH7.2-7.6

4%多聚甲醛溶液(4%PFA)

透膜液(0.5% TritonTM X-100 in PBS)

蛋白酶 K 溶液(20 μ g/ml) (组织切片检测用)

组织切片脱水所用试剂(二甲苯、梯度酒精)

流式细胞分析管

48/96 孔细胞培养板

免疫组化笔

去离子水

使用前须知

1. 试剂请置于冰上融化，开盖前需瞬时离心，使用完及时放回-20℃保存。
2. 实验可设置阳性对照组，每批实验设置一个阳性对照组，阳性对照细胞可用 DNase I 处理，本试剂盒包含 10 次的阳性对照试剂量。
3. 每次实验建议设置阴性对照组，阴性对照组不加 TdT Enzyme。
4. 酶制剂较粘稠，取样体积小，需注意移液器取样操作规范。
5. 荧光试剂需避光使用。
6. 本试剂盒仅用于科学研究，不用于临床诊断。

使用方法

➤ 细胞固定及通透

1. 对于悬浮细胞或细胞悬液：

- a. 收集细胞 $1-2 \times 10^6$ 个细胞，用 PBS 洗涤一次。
- b. 用 4%多聚甲醛室温固定 10-15 分钟。
- c. 用 PBS 洗涤 1-2 次。
- d. 用 0.5ml 透膜液 (0.5% Triton™ X-100 in PBS) 重悬细胞，室温孵育 5 分钟。
- e. 用 PBS 洗涤 2 次。

2. 对于贴壁细胞(48/96 孔板)或细胞涂片：

- a. 用 PBS 洗涤 1 次。
- b. 用 4%多聚甲醛室温固定 10-15 分钟。
- c. 用 PBS 洗涤 1-2 次。
- d. 每孔加 0.1-0.2ml 透膜液 (0.5% Triton™ X-100 in PBS)，室温孵育 5 分钟。
- e. 用 PBS 洗涤 2 次。

3. 对于石蜡切片：

- a. 二甲苯脱蜡 10-15 分钟，新二甲苯脱蜡 10-15 分钟。无水乙醇 5 分钟，90%乙醇 2 分钟，80%乙醇 2 分钟，70%乙醇 2 分钟，之后放于 PBS 中洗涤 3 次，每次 5 分钟。
- b. 擦干组织周围的液体，组化笔在组织周围画圈，圈中加适量 20μg/ml 的蛋白酶 K(不含 DNA 酶)，室温孵育 15-30 分钟。
- c. 用 PBS 洗 3 次。注：蛋白酶 K 需洗涤干净，以免影响后续反应。

4. 对于冰冻切片：

- a. 用 4%多聚甲醛室温固定 30-40 分钟。
- b. 用 PBS 洗涤 2 次，每次 5 分钟。
- c. 加入透膜液 (0.5% Triton™ X-100 in PBS)，室温孵育 5 分钟。
- d. 用 PBS 洗涤 2 次。

➤ 阳性对照样品处理（可选）

1. 用去离子水以 1:10 比例稀释 10 X DNase I Buffer 至 1X，将 50μl 1X DNase I Buffer 滴加至组织或细胞，室温平衡 5 分钟。
2. 参照下表配制 DNase I 反应液：

	1 个样品
10 × DNase I Buffer	5μl
DNase I	2.5μl
ddH ₂ O	42.5μl
总体积	50μl

3. 去除 1X DNase I Buffer，将 DNase I 反应液加入组织或细胞，37℃ 孵育 30 分钟(48 孔板可放置摇床，转速 200 转每分钟；96 孔板可不放摇床)。
4. 用 PBS 洗涤 2-3 次。

➤ TUNEL 检测

参考下表配制适量 TUNEL 检测液，需充分混匀，现用现配。

	1 个样品	5 个样品	10 个样品
TdT Enzyme	1μl	5μl	10μl
5 × Equilibration Buffer	10μl	50μl	100μl
555-dUTP	5μl	25μl	50μl
ddH ₂ O	34μl	170μl	340μl
总体积	50μl	250μl	500μl

1. 对于贴壁细胞、细胞涂片或组织切片：

- a. 去除 PBS，每个样品加 50μl TUNEL 检测液，37℃ 避光孵育 60 分钟 (48 孔板可放置摇床，转速 200 转每分钟)。注：根据样品面积适当增加 TUNEL 检测液的用量。组织切片或细胞涂片可在滴加 TUNEL 检测液后覆盖塑料片以防蒸发。
- b. 用 PBS 洗涤 2 次。
- c. 染核(可选)，用 PBS 以 1：500 稀释 Hoechst33342 配制足量染色液，室温避光染色 5-10 分钟。
- d. 用 PBS 洗涤 2 次。
- e. 封片，荧光显微镜下观察。555-dUTP 激发光/发射光为 550/561nm。Hoechst33342 激发光/发射光为 346/460nm。

2. 对于悬浮细胞或细胞悬液：

- a. 去除 PBS，每个样品加 50μl TUNEL 检测液，涡旋混匀，37℃ 避光孵育 60 分钟，期间可每隔 15 分钟涡旋一次。
- b. 用 PBS 洗涤 2 次。

- c. 染核(可选), 用 PBS 以 1: 500 稀释 Hoechst33342 配制足量染色液, 室温避光染色 5-10 分钟。
- d. 用 PBS 洗涤 2 次。
- e. 用 300-500 μ l PBS 悬浮细胞。
- f. 用流式细胞仪检测或在荧光显微镜下观察。