

TUNEL细胞凋亡检测试剂盒 (FITC绿色) (货号: CSP168)

包装规格: 20T

【产品描述】

细胞在发生凋亡时, 一些核酸内切酶会被激活, 开始切断核小体间的基因组 DNA, DNA 被切断后会产生缺口, 并暴露出 3' -OH 末端, 在末端脱氧核苷酸转移酶 (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 的催化下可以连接经过标记的 dUTP。因为正常的细胞几乎没有 DNA 的断裂, 所以针对 dUTP 进行检测即可判断待测细胞的凋亡状态, 这种方法也被称为 TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) 法检测细胞凋亡。

本产品是用生物素 (Biotin) 标记 dUTP, 并可与连接 FITC 的链霉亲和素 (Streptavidin-FITC) 特异结合, 通过这种生物素-链霉亲和素放大系统, 使 FITC 标记的链霉亲和素与生物素结合, 从而可以在荧光显微镜下观察并计数凋亡细胞。本产品适用于组织样本 (石蜡包埋、冰冻和超薄切片) 和细胞样本 (细胞涂片或爬片) 的凋亡原位检测。对于经过固定和洗涤的细胞或组织, 只要经过一步染色反应, 洗涤后就可以通过荧光显微镜检测到凋亡细胞。

【组成成分】

组分	20T
10×蛋白酶 K	200 ul
DNase I (50 U/ul)	200 ul
DNase I Buffer	200 ul
平衡液	1 ml
TdT 酶	80 μl
Biotin-dUTP	20 ul
Streptavidin-FITC	100 μl
标记缓冲液	1 ml

保存: -20℃避光保存, Streptavidin-FITC、标记缓冲液 4℃保存, 有效期12个月。

【操作说明】**一. 样品处理:****(a) 细胞涂片或冷冻切片**

- 1、将自然晾干的细胞样本 (细胞涂片或爬片) 或冷冻切片浸入盛有 4%多聚甲醛固定液的染色缸, 室温 (15-25℃) 固定 20-30min。
- 2、样本片浸入 1×PBS 漂洗三次, 每次 5min。
- 3、配制 1%Triton X-100 通透液 (例如往 99ml 的 1×PBS 溶液中加入 1 ml Triton X-100), 混匀, 即用即配。
- 4、样本片浸入通透液中, 室温 3-5min; 之后浸入 1×PBS 漂洗三次, 每次 5min。

(b) 石蜡切片

- 1、切片按常规方法进行脱蜡，60℃烘干 60min 后，二甲苯脱蜡 2 次，乙醇水合（100%，95%，80%，75%）每次 5min。
- 2、然后浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。
- 3、配制蛋白酶 K 工作液：计算好样本数量集中配制，每样本 90ul 1×PBS 加入 10ul 10×蛋白酶 K，即用即配。
- 4、每个组织切片上滴加 100ul 蛋白酶 K 工作液，37℃反应 30min。切片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min（注意：对于部分固定过久的样本可选用微波方法：将切片置于 pH6.0 柠檬酸盐缓冲液中，微波中高火 8min 后，取出降温）。

二. 制备阳性对照：

- 1、根据样本类型不同，配置 100ul 含不同活性单位（U）的 DNase I 反应液，配方如下：

样本类型	细胞样本	冷冻切片	石蜡切片
U/ 100ul	1000U-2000U	2000 U-3000 U	3000U-5000U
DNase I (50 U/ul) 用量	20ul-40ul	40ul-60ul	60ul-100ul
DNase I Buffer 用量	80ul-60ul	60ul-40ul	40ul-0ul

- 2、在一张样本上滴加 100ul 配制好的 DNaseI 反应液，在 37℃处理 30min。
- 3、上述制备好的阳性对照浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。

注：阳性对照只针对实验体系进行设置对照，不需要每片制备。

三. 连接：

- 1、配制 TdT 酶反应液：计算好样本数量集中配制（不计算阴性对照）：每个样本需要 45ul 平衡液+ 1ul Biotin-dUTP + 4ul TdT 酶，即用即配，注意避光操作。
- 2、样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50ul TdT 酶反应液，放入温盒中，37℃避光反应 60min（注：阴性对照样本不加 TdT 酶反应液）。
- 3、反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。

四. 标记：

- 1、配制 Streptavidin-FITC 工作液，计算好样本数量集中配制：每个样本需要 45ul 标记缓冲液加入 5ul Streptavidin-FITC，即用即配，注意避光。
- 2、样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50ul Streptavidin-FITC 工作液，放入温盒中，37℃避光反应 30min。
- 3、反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min，注意避光。

五. 检测:

使用 DAPI 染色液复染细胞核, 室温避光反应 10min, 洗去 DAPI 染色液, 加适量封片剂 (甘油: PBS=6: 4) 封片, 激发波长调至 450-500nm, 发射波长调至 515-565nm, 显微镜观察。

(注: 荧光易淬灭, 请尽快观察拍照)。

注意事项

- 本产品仅限于科学研究使用。
- 实验前可将各个样本用免疫组化笔进行标记, 另外需要准备 2 张样本切片分别用于阳性对照和阴性对照制备并做好对应标记。
- 各个工作液最好根据计算好的样本数量集中配制, 再分别滴加于各样本上, 避免因每个样本单独配制而产生的试剂损耗, TdT 酶反应液如需短暂保存时, 请置于冰上。
- 对 Streptavidin-FITC 操作时需要注意避光。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套和口罩操作。

警告:如果操作不当, 培养基的某些成分可能会对健康造成危害。处理时应采取适当的预防措施, 包括穿戴防护服和眼镜。