

TUNEL Apoptosis Detection Kit (TRITC)

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（TRITC 红色荧光标记法）

产品编号	产品名称	规格
BL644A	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（TRITC红色荧光标记法）	20T
BL644B	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（TRITC红色荧光标记法）	50T
BL644C	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（TRITC红色荧光标记法）	100T

产品简介：

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，并可与连接红色荧光素（Tetramethylrhodamine, TRITC）的链霉亲和素（Streptavidin-TRITC）特异结合，通过这种生物素-链霉亲和素放大系统，使 TRITC 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。

产品组成：

组分	BL644A（20T）	BL644B（50T）	BL644C（100T）
10×蛋白酶 K	200 ul	500 ul	1 ml
DNase I（50 U/ul）	200 ul	500 ul	1 ml
DNase I Buffer	200 ul	500 ul	1 ml
平衡液	1 ml	2.5 ml	5 ml
TdT 酶	80 μl	200 ul	400 ul
Biotin-dUTP	20 ul	50 ul	100 ul
Streptavidin-TRITC	100 μl	250 ul	500 ul
标记缓冲液	1 ml	2.5 ml	5 ml

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



使用方法:

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 DNase I 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-TRITC 工作液，计算好样本数量集中配制：每个样本需要 45ul 标记

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



缓冲液加入 5ul Streptavidin-TRITC，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-TRITC 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 543nm，发射波长调至 571nm，显微镜观察。（注：荧光易淬灭，请尽快观察拍照）。

注意事项:

1、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。

2、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。

3、对 Streptavidin-TRITC 操作时需要注意避光。

4、本产品仅限于专业人员科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件:

-20℃ 保存，Streptavidin-TRITC、标记缓冲液 4℃ 保存，有效期一年。

