

TransDetect[®] In Situ Fluorescein TUNEL Cell Apoptosis Detection Kit TUNEL法细胞凋亡检测试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FA201

版本号: Version 1.0

保存: TdT -18℃及其以下温度下保存一年, 1×Labeling Solution -18℃及其以下温度下避光保存一年。

产品说明

末端脱氧核苷酸转移酶 (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT), 是一种不依赖模板的DNA聚合酶, 可以催化脱氧核苷酸结合到断裂DNA分子的3'-OH末端, 且突出、凹陷或平滑末端的单链或双链DNA分子均可作为其底物。细胞凋亡发生时, 相关DNA内切酶会被激活, 从而切断核小体间的DNA。在细胞凋亡晚期, DNA会被降解为180-200 bp的片段。TdT介导的dUTP末端标记法 (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling, TUNEL)是在TdT的催化下将荧光素 (fluorescein, FITC)标记的dUTP (FITC-dUTP) 与断裂DNA暴露的3'-OH聚合, 延伸后的DNA可通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测。本产品适用于石蜡组织切片、冰冻组织切片、细胞爬片、细胞涂片以及细胞悬液的检测。

特点

- 毒性极低, 不含有传统TUNEL反应所依赖的高毒性有机砷化合物缓冲体系。
- 灵敏度高, 特异性强, 标记与非标记底物采用最佳优化比例。
- 操作简便, 无需繁琐的加样及孵育过程, 反应体系中只需将TdT与Labeling Solution混合, 即可完成一步法标记。
- 应用范围广, 检测方式灵活。

试剂盒组成

Component	FA201-01 (25 rxns)	FA201-02 (50 rxns)
TdT	50 µl	100 µl
1×Labeling Solution	1.25 ml	2×1.25 ml

操作步骤

自备

Product Name	Catalog
PBS (1×)	TransGen, Cat. FG701-01
DNase I (RNase-free)	TransGen, Cat. GD201-01

甲醛固定液 (含3%甲醛、2%蔗糖的1×PBS)

细胞通透液 (含0.1% Triton X-100的1×PBS)

抗淬灭封片剂

A、石蜡组织切片 (以小鼠脾4 µm横切片为例)

1、脱蜡和复水

采用二甲苯浸泡脱蜡及梯度乙醇 (例如95%、90%、85%、75%、50%) 浸泡复水的方法处理石蜡组织切片, 复水后的切片在染缸内用1×PBS浸没静置5分钟, 取出切片, 小心吸去切片周围的液体, 并确保切片表面湿润。

2、通透

向切片表面滴加100 µl细胞通透液, 室温静置5分钟。

3、标记

将50 µl 1×Labeling Solution与2 µl TdT混匀后滴加至切片表面, 37℃避光标记1小时。

(注意: 可依样本的大小适当增减标记液的用量, 标记液应以完全覆盖切片样本表面为宜, 反应体系过小或液体不足均会导致实验失败。另外, 本步骤请确保在湿盒内完成, 以避免反应过程中由于液体蒸发而导致的细胞干涸。从本步骤开始请尽量采取避光操作, 以降低荧光淬灭。)



4、向切片的标本上滴加100 μ l细胞通透液，室温静置5分钟，然后小心吸净切片周围液体，重复此操作3次。

5、小心吸净切片周围液体，滴加2.5 μ l 抗淬灭封片剂，使用盖玻片封片，通过荧光显微镜观测荧光，选择FITC检测滤镜，激发波长范围为450-500 nm，发射波长范围为515-565 nm。

B、冰冻组织切片 (以小鼠脾4 μ m横切片为例)

1、固定

已经固定好的冰冻组织切片可直接进行下一步操作；未经固定的切片在染缸内浸没于甲醛固定液中，室温固定30分钟，随后在染缸内用1 $\times$ PBS浸没静置洗涤3次，每次5分钟。

2、以下步骤同石蜡组织切片操作步骤2-5。

C、固定细胞片 (以14 mm细胞爬片为例)

1、按常规方法制作细胞爬片或细胞涂片。

2、固定

在24孔板内操作，每孔加入0.5-1 ml甲醛固定液，室温固定30分钟。随后每孔用1 ml 1 $\times$ PBS静置洗涤3次，每次5分钟。

3、通透

吸干上一步残留液体，滴加100 μ l细胞通透液，室温静置5分钟。

4、以下步骤同石蜡组织切片操作步骤3-5。

D、细胞悬液的流式细胞术检测

1、细胞悬液经500 $\times$ g离心5分钟，弃掉培养液，用1 ml 1 $\times$ PBS洗两次，500 $\times$ g离心5分钟，弃上清。

(注意：为了确保后续实验的可靠性，推荐细胞总数 $\geq 1 \times 10^5$ 。)

2、固定

加入1 ml甲醛固定液，轻柔颠倒数次以充分重悬细胞，室温固定30分钟 (期间应颠倒重悬2-3次)。

3、用1 ml 1 $\times$ PBS洗细胞3次，500 $\times$ g离心5分钟，弃上清。

(注意：清洗过程动作宜轻柔，小心颠倒重悬后离心即可。)

4、通透

加入1 ml细胞通透液，轻柔地重悬细胞并室温静置10分钟 (期间应颠倒重悬2-3次)。

5、标记

500 $\times$ g离心5分钟，弃上清，将250 μ l 1 $\times$ Labeling Solution 与10 μ l TdT混匀后加入其中，随后轻柔地充分重悬，37 $^{\circ}$ C避光标记1小时 (期间应颠倒重悬数次)。

6、500 $\times$ g离心5分钟，弃上清，用1 ml细胞通透液轻柔地充分重悬细胞，重复此操作2次，随后用1 ml 1 $\times$ PBS轻柔地充分重悬细胞，进行流式细胞仪检测 (注意避光)。

E、阳性对照的处理

1、将阳性对照组织切片或者细胞样本与实验组样本按照上述方法一同进行通透处理。随后用细胞通透液稀释10 $\times$ DNase I Reaction Buffer至1 $\times$ ，并加入DNase I (终浓度10-15 U/ml)，混匀后加至阳性对照样本。上述切片样本加入量为100 μ l，细胞爬片加入量为50 μ l，室温孵育15-30分钟。

(注意：如果采用其它公司的DNase I，酶的用量及孵育时间均需经过预实验确定。)

2、用100 μ l细胞通透液洗阳性对照样本3次，每次5分钟。

3、标记及后续步骤同上述A-D的相应操作进行。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

