

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-CY3 (50T)

(TUNEL Apoptosis Detection Kit IV, CY3)

产品编号: MK1016

保存条件: -20°C冰冻保存。

保存期: 一年

工作原理

在机体内部随时都在发生着细胞的死亡。传统上用显微镜来观察细胞的死亡,其特征为核染色质的浓缩及碎片的形成。但是这种现象出现的很晚,时间也很短暂。凋亡的特征是内源性核酸内切酶被激活,细胞自身的染色质或 DNA 被切割,出现单链或双链缺口,并产生与 DNA 断点数目相同的 3'-OH 末端。末端脱氧核糖核酸转移酶(Terminal deoxynucleotidyl Transferase)可以将地高辛标记的 dUTP (DIG-dUTP) 标记至 3'-OH 末端, DIG-dUTP 结合在 DNA 断点部位,可以通过生物标记的抗地高辛抗体 (Anti-DIG-Biotin) 反应后,再结合 链酶亲和素-荧光素 CY3(SABC-CY3)。Cy3 在 554nm 激化,在 568-574nm 发射荧光,呈鲜红色,从而可以在显微镜下观察到着色的凋亡细胞。

试剂盒内容

1. 标记缓冲液(Labeling Buffer)	3ml
2. 末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT,×20)	50μl
3. DIG-dUTP (×20)	50μl
4. 封闭液(Blocking Reagent)	10ml
5. 生物素化抗地高辛抗体(× 100)	50μl
6. SABC-CY3 (×100)	50μl
7. Proteinase K (×200)	125μl
8. 抗体稀释液	10ml
9. 阳性对照片 2 张	

用户自备试剂

1. 多聚赖氨酸或 APES(博士德公司有售)。
2. 0.01M TBS,PH7.5(配法:1L 双蒸馏水中加入 8.5 克氯化钠,1.2 克 Tris 和 0.45—0.5ml 纯乙酸。)
3. DAPI 染色液 (货号 AR1176, AR1177)
4. 水溶性封片剂或抗荧光衰减封片剂。

操作步骤

1. 样品处理

- (1) 玻片预先用多聚赖氨酸或 APES 进行处理。
- (2) 细胞涂片和冰冻切片:最重要的是及时固定。用 4%多聚甲醛/0.01M PBS(PH7.0---7.6)室温下固定 30—60 分钟。0.01M PBS 洗 2 分钟×2 次。蒸馏水洗涤 2 分钟×2 次。
- (3) 组织:有条件时应及时固定。常规 4%多聚甲醛/0.01M PBS(PH7.0---7.6)或 10%中性缓冲

福尔马林固定 4 小时以上，石蜡包埋。切片常规脱蜡入水（脱蜡务必干净）。

2. 标本片加 0.01M TBS 1:200 新鲜稀释 Proteinase K 37℃消化 1—15 分钟,0.01M TBS 洗 2 分钟×3 次。(细胞涂片和冰冻切片一般不消化或消化 10—60 秒钟。新鲜石蜡切片消化 5-10 分钟。陈旧石蜡切片消化 10-15 分钟)。

3. 标本片加标记缓冲液(Labeling Buffer) 20μl /片,以保持切片湿润。按每张切片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1μl , 加入 18μl 标记缓冲液中, 混匀。甩去切片上多余液体后加标记液, 20μl /片。置样品于湿盒中, 37℃标记 2 小时。

4. 0.01M TBS 洗 2 分钟×3 次。

5. 加封闭液 50μl /片, 室温 30 分钟, 甩掉封闭液, 不洗。

6. 用抗体稀释液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体:(取 1ml 抗体稀释液加生物素化抗地高辛抗体 10μl), 混匀后 50μl/片加至标本片上。置样品于湿盒中, 37℃反应 30 分钟。0.01M TBS 洗 2 分钟×3 次。

7. 用抗体稀释液 1:100 稀释 SABC: 取 1ml 抗体稀释液加 SABC 10μl, 混匀后 50μl /片加至切片。37℃反应 30 分钟。0.01M TBS 洗 5 分钟×4 次。

8. 必要时可用 DAPI 染色液(货号 AR1176, AR1177) 轻度复染, 蒸馏水洗。抗荧光衰减封片剂封片(可用甘油代替)。荧光显微镜观察。

结果判定

细胞核中有鲜红色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡的细胞。

注意事项

1. 试剂盒严格-20℃存放。

2. 初用时如试管底部无可见的试剂, 在离心机离心 5 分钟, 使试剂沉至管底。

3. 检测过程中切勿使样品干涸。