

# TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-CY3 (100T)

## (TUNEL Apoptosis Detection Kit, CY3)

**产品编号:** MK1026

**保存条件:** -20°C冰冻保存一年。

### 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) | 5ml   |
| 2. 末端脱氧核糖核酸转移酶 (TdT, ×20)  | 100μl |
| 3. DIG-dUTP (×20)          | 100μl |
| 4. 封闭液 (Blocking Reagent)  | 20ml  |
| 5. 生物素化抗地高辛抗体 (×100)       | 100μl |
| 6. SABC-CY3 (×100)         | 100μl |
| 7. Proteinase K (×200)     | 250μl |
| 8. 抗体稀释液                   | 20ml  |

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, 调 pH 7.5 (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。