

产品说明书

产品名称: Cy3 TUNEL Assay Apoptosis Detection Kit

产品货号: BN16067

产品规格: 20T, 50T

产品内容:

组分	20T	50T
A. TUNEL Equilibration Buffer	2×1mL	5mL
B. Cy3 TUNEL Reaction Buffer	2×0.5mL	5×0.5mL
C. TdT Enzyme	20 μL	50 μL

储存条件

本产品应置于-20℃储存; TUNEL Reaction Buffer 避光储存于-20℃, 避免反复冻融。本产品推荐条件下可以储存 12 个月。

注意: TUNEL Equilibration Buffer 和 TUNEL Reaction Buffer 中含有有毒、致癌成分 Sodium cacodylate trihydrate 和 Cobaltous chloride, 使用时请佩戴口罩、手套。接触皮肤后, 请立即有大量水冲洗, 废液请按有毒物质处理。

产品介绍

细胞凋亡的一个显著特点是细胞染色体 DNA 的降解, 这是一个较普遍的现象。这种降解非常特异并有规律, 所产生的不同长度的 DNA 片段约为 180 bp-200 bp 的整数倍, 表现为琼脂糖凝胶电泳中呈现特异的梯状 Ladder 图谱, 本试剂盒采用 TUNEL 法, 应用末端脱氧核糖核苷酸转移酶 (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 在凋亡细胞断裂 DNA 的 3'-OH 末端催化掺入 Cy3-dUTP。Cy3-dUTP 标记的 DNA 可以用荧光显微镜直接观察或者用流式细胞仪定量。TUNEL 法可以选择性的检测凋亡细胞, 而非坏死细胞或因辐照和药物治疗而造成的 DNA 链断裂的细胞。TUNEL 实验中, TdT 酶催化 dUTP 掺入断裂的 DNA 链的 3' 羟基末端。抗原标记的 dUTP (如 digoxin-dUTP、生物素-dUTP), 因为它可以直接进行原位检测, 是一种更快

速、直接的检测手段。

使用方法

实验材料 (自备)

- PBS 缓冲液 (pH~7.4)
- 4%多聚甲醛 (in PBS)
- 牛血清白蛋白(BSA) 或正常的羊、牛血清
- 70%乙醇 (自选)
- 脱蜡溶剂 (石蜡切片样本)
- 蛋白酶 K (石蜡切片样本)

实验步骤

1. 样本准备:

1.1 细胞或新鲜冰冻组织切片

- 1) 可选: 准备一份阴性对照样本 (加入不含 TdT 酶的 TUNEL 反应液)。
- 2) PBS 清洗细胞或组织两次。
- 3) 细胞固定: 加入适量 4%多聚甲醛(pH 7.4)溶液, 4℃ 放置 30 min (新鲜冰冻切片不需要此步操作)。
- 4) PBS 清洗细胞两次。
- 5) 通透细胞: 加入冰上预冷的 70%乙醇, 在-20℃孵育 4 h。细胞能在 70%乙醇中-20℃的条件下保存一周。或者细胞可用配制于 PBS 中的 0.2% Triton X-100 溶液通透, 室温放

置 20 min。

6) PBS 清洗细胞两次。

1.2 石蜡组织切片

1) 可选：准备一份阴性对照样本（加入不含 TdT 酶的 TUNEL 反应液）。

2) 按照标准方法进行切片脱蜡和水化处理。

3) PBS 清洗细胞两次。

4) 用 PBS 稀释的终浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白酶 K 溶液透化组织，37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min（蛋白酶 K 的孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化）。

5) PBS 清洗细胞两次，每次 5 min。

2. TUNEL 反应

1) 每个样本加入 100 μL TUNEL 平衡缓冲液，孵育 5 min。

2) 预先配制 TUNEL 反应混合液：每个样本需要已加入 1 μL TdT 酶的 50 μL TUNEL 反应缓冲液。

3) 弃去平衡缓冲液，每个样本加入 50 μL TUNEL 反应混

合液。

a) 贴壁细胞或组织样本，用盖玻片使缓冲液均匀覆盖样本。

b) 悬浮细胞，可加入微孔板中，采用微孔板振荡器进行孵育或每隔 15 min 温和的震荡反应管，使之充分反应。

4) 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min，组织样本需要 2 h。

5) 300g 离心，去上清，使用适量配制于 PBS 中的 0.1% Triton X-100，其中含 5 mg/ml BSA 的缓冲液清洗样本 3 次。

6) 根据需要进行复染。用荧光显微镜或流式细胞仪观察、分析，Cy3 的激发波长为 550nm，发射波长为 570nm。（凋亡细胞应被标记上明亮的红色荧光，没有加入 TdT 酶的阴性对照样本未被标记上荧光）。

注意事项：

1. 荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。