

## Cy3TUNELAssayApoptosisDetectionKit

### 产品描述:

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 180bp-200bp 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 DeoxynucleotidylTransferase,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'-OH 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。

### 订购信息:

产品名称	货号	规格	价格
Cy3TUNELAssayApoptosisDetectionKit	YL0040-1	20T	1880
Cy3TUNELAssayApoptosisDetectionKit	YL0040-2	50T	3480

### 产品组分:

组分	20T	50T
A.TUNELEquilibrationBuffer	2×1mL	5mL
B.Cy3TUNELReactionBuffer	2×0.5mL	5×0.5mL
C.TdTEnzyme	20μL	50μL
D.ProteinaseK(2mg/mL)	40μL	100μL
E.DNaseI(2U/μL)	5μL	13μL
F.10×DNaseIBuffer	100μL	260μL

### 运输与保存:

蓝冰运输。-20℃保存; 组分 B 需避光保存于-20℃, 避免反复冻融。有效期见外包装。

**【注】:** 组分 A、B 中含有有毒、致癌成分 Sodiumcacodylatetrihydrate 和 Cobaltouschloride, 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。

实验材料 (自备)

PBS 缓冲液 (pH~7.4)

4%多聚甲醛 (inPBS)

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)

### 操作步骤:

#### 1. 样本准备:

细胞样品

(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 2 次。
- (3) 细胞固定：加入适量 4%多聚甲醛(pH7.4)溶液，4°C放置 30min。
- (4) PBS 清洗细胞 2 次。
- (5) 通透细胞：加入冰上预冷的 70%乙醇，在-20°C孵育 4h。细胞能在 70%乙醇中-20°C的条件下保存 1 周。或者细胞可用配制于 PBS 中的 0.2%TritonX-100 溶液通透，室温放置 20min。
- (6) PBS 清洗细胞 2 次。

#### 石蜡组织切片

- (1) 室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片 2 次，每次 5min，以彻底脱掉石蜡。  
**【注】：**二甲苯有毒，易挥发，请在通风橱中进行此操作。
- (2) 室温下，将切片样本浸没于无水乙醇中漂洗 2 次，每次 5min。
- (3) 室温下，将切片样本连续浸没在不同浓度梯度的乙醇（95%、90%、80%、70%）中，每种浓度各漂洗 1 次，每次 5min。
- (4) 室温下，将切片浸没于纯水中漂洗 1 次，每次 3min，再将切片浸没于 1×PBS 中漂洗 1 次，每次 3min，用滤纸小心吸干切片样本周围多余液体。
- (5) 用免疫组化笔在切片样本周围描绘样品轮廓，以便下游通透与标记。
- (6)按 1:100 的比例，将 2mg/mL 的 ProteinaseK 溶液用 1×PBS 稀释，使其终浓度为 20μg/mL。

每

个样本上滴加 100μL 稀释好的 ProteinaseK 溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 20min（Proteinase K 的孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化）。

**【注】：**蛋白酶 K 可以帮助渗透组织，但延长孵育时间可能导致切片脱落，所以要最优化孵育时间长短。时间一般为 10~30min，4μm 左右的片子可以用 10min，但 30μm 左右的可用 30min。过长易脱片、过短起不到通透效果。

(7) PBS 浸润清洗切片 2 次，每次 5min，用滤纸吸去多余的液体，将处理好的样品放在湿盒中保持湿润。**【注】：**这一步必须把蛋白酶 K 洗涤干净，否则会严重干扰后续的标记反应。

#### 冰冻组织切片

- (1) 将冰冻切片放置于室温的片架上，室温 20min，晾干。
- (2) 将载玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液（inPBS）中，室温固定 30min。
- (3) PBS 浸润清洗切片 2 次，每次 5min。
- (4) 用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。
- (5)按 1:100 的比例，将 2mg/mL 的 ProteinaseK 溶液用 1×PBS 稀释，使其终浓度为 20μg/mL。

每

个样本上滴加 100μL 稀释好的 ProteinaseK 溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 10min（Proteinase K 的孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化）。

**【注】：**蛋白酶 K 可以帮助渗透组织，但延长孵育时间可能导致切片脱落，所以要最优化孵育时间长短。时间一般为 10~30min，4μm 左右的片子可以用 10min，但 30μm 左右的可用 30min，需摸索最佳时间。过长易脱片、过短起不到通透效果。

(6) PBS 浸润清洗切片 2 次，每次 5min，用滤纸吸去多余的液体，将处理好的样品放在湿盒中保持湿润。

阳性处理(仅阳性对照进行此步骤，其他样品直接进行 TUNEL 反应步骤)

- (1) 按 1:10 的比例用 ddH<sub>2</sub>O 将 10×DNaseI Buffer 稀释成 1×DNaseI Buffer 备用。
- (2) 滴加 100μL 1×DNaseI Buffer 到已通透的样本上，室温平衡 5min。
- (3) 用 1×DNaseI Buffer 以 1:100 稀释 DNaseI (20U/μL)，使其为终浓度 20U/mL 的工作液。
- (4) 轻轻吸掉多余液体，加入 100μL 浓度为 20U/mL DNaseI 工作液，室温孵育 10min。
- (5) 轻轻吸掉多余液体，PBS 清洗样品 2 次。

#### 2.TUNEL 反应：

- (1) 每个样本加入 100μL TUNEL 平衡缓冲液，孵育 5min。
- (2) 预先配制 TUNEL 反应混合液：每个样本需要已加入 1μL TdT 酶的 50μL TUNEL 反应缓冲

液。（3）弃去平衡缓冲液，用滤纸小心吸去切片样本周围的多余液体，每个样本加入 50 $\mu$ L TUNEL 反应混合液。

a. 贴壁细胞，用盖玻片使缓冲液均匀覆盖样本。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60min。

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 15min 温和的震荡反应管，使之充分反应。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60min。

c. 组织样本，用盖玻片使缓冲液均匀覆盖样本。将样本平放于湿盒内，37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 2h，湿盒底部铺一张含少量水的纸巾保持湿度。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2h。

d. 去掉反应液，在 1 $\times$ PBS 的染色缸中浸泡润洗 2 次，每次 5min。再使用适量配制于 PBS 中的 0.1% TritonX-100，其中含 5mg/mL BSA 的缓冲液清洗样本 3 次，每次 5min，以降低背景。

（5）（可选）复染：每个样本滴加浓度为 2 $\mu$ g/mL 的 DAPI 染液，避光室温孵育 10min。染色完后，轻轻去掉染液，并将样本在 1 $\times$ PBS 中浸泡润洗 3 次，每次 5min。

（6）（可选）封片：将切片样本先纯水浸没 5min，再放入 70% 乙醇浸没 5min，再 80% 乙醇浸没 5min，90% 乙醇浸没 5min，95% 乙醇浸没 5min，无水乙醇浸没 5min，最后将切片样本置于染色缸中以新鲜的二甲苯浸泡透明化处理 2 次，每次 5min（通风厨中操作）。脱水完成后，擦去切片周围的液体，每个切片样本滴加 50 $\mu$ L 抗荧光淬灭封片液，盖上盖玻片，用镊子的钝端轻轻敲击盖玻片，去除气泡以使封片完全。（7）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. 本产品仅限于科学实验研究使用，不得用于临床诊断、治疗等领域。

2. 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。

3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 相关产品推荐:

细胞转染试剂（高效）。货号：(YL0026)

无血清细胞冻存液。货号：(YH0027)