



TUNEL 细胞凋亡两步法检测试剂盒-CY3 (50T)

(TUNEL Apoptosis Detection Kit I, CY3)

产品货号: MK1012

产品名称: TUNEL 细胞凋亡两步法检测试剂盒-CY3 (50T)

产品批号: 见外包装标签

产品保存: -20°C保存, 一年有效。

产品组份:	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. BIO-dUTP(×20)	50μl
	4. 封闭液(Blocking Reagent)	10ml
	5. SABC-CY3 (×100)	50μl
	6. Proteinase K (×200)	125μl
	7. SABC 稀释液	10ml
	8. 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 (AR0031 博士德公司有售)(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. DAB 染色液(货号 AR1027), 也可自配显色剂。
4. 水溶性封片剂或抗荧光衰减封片剂(货号 AR1018/AR1109/AR0036)。

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)可以将生物素标记的 dUTP (BIO-dUTP) 标记至 3'-OH 末端, BIO-dUTP 结合在 DNA 断点部位, 再结合链酶亲和素-荧光素 CY3 (SABC-CY3)。CY3 在 554nm 激发, 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。

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