



## Cy3 TUNEL Assay Apoptosis Detection Kit

### 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 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'-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
Cy3 TUNEL Assay Apoptosis Detection Kit	AC12L084	20T
Cy3 TUNEL Assay Apoptosis Detection Kit	AC12L085	50T

### 产品组分

组分	AC12L084 (20T)	AC12L085 (50T)
A. Cy3 TUNEL Reaction Buffer	1 mL	2 * 1.25 mL
B. TdT Enzyme	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L
C. Proteinase K (2 mg/mL)	40 $\mu$ L	100 $\mu$ L
D. DNase I (2 U/ $\mu$ L)	5 $\mu$ L	13 $\mu$ L
E. 10 $\times$ DNase I Buffer	100 $\mu$ L	260 $\mu$ L

### 运输与保存

蓝冰运输。-20°C避光保存, 有效期 24 个月。【注】: 避免反复冻融。

### 实验材料 (自备)

PBS 缓冲液 (1 $\times$ , pH~7.4)  
0.2% Triton X-100 (PBS 配制)  
0.1% Triton X-100 (PBS 配制, 其中含 5 mg/mL BSA)  
4%多聚甲醛 (PBS 配制)  
免疫组化笔  
脱蜡溶剂 (石蜡切片样本)  
石蜡切片处理相关试剂  
抗荧光淬灭封片剂  
ddH<sub>2</sub>O



## 使用方法

### 一、实验设计

1. 阳性对照 (可选) : DNase I 处理制备阳性对照载玻片。DNase I 可以消化单链或双链 DNA 产生单脱氧核苷酸或单链或双链的寡脱氧核苷酸的核酸内切酶, 人为造成细胞凋亡。
2. 阴性对照 (可选) : 使用不含 TdT Enzyme 的 TUNEL Reaction Buffer, 用 ddH<sub>2</sub>O 替代 TdT Enzyme。
3. 实验处理组。
4. 实验对照组。

### 二、实验步骤

#### 1. 样本准备:

##### 对于贴壁细胞或细胞涂片

- (1) PBS 清洗 1 次。【注】: 如果担心细胞涂片的细胞贴得不牢, 可以干燥样品使细胞贴得更牢。
- (2) 固定: 加入适量 4%多聚甲醛 (PBS 配制), 室温固定 30 min。PBS 清洗 2 次。
- (3) 通透: 加入适量 0.2% Triton X-100 (PBS 配制), 室温通透 20 min。PBS 清洗 2 次。
- (4) 转步骤 2. TUNEL 反应。

##### 对于悬浮细胞或细胞悬液

- (1) 收集细胞 (3-5×10<sup>6</sup>个细胞), 1000 rpm 离心 5 min, PBS 清洗 2 次。
- (2) 固定: 加入适量 4%多聚甲醛 (PBS 配制) 充分重悬细胞, 4°C固定 30 min。2000 rpm 离心 5 min, PBS 清洗 2 次。
- (3) 通透: 加入适量 0.2% Triton X-100 (PBS 配制), 室温通透 20 min。2000 rpm 离心 5 min, PBS 清洗 2 次。
- (4) 转步骤 2. TUNEL 反应。

##### 石蜡组织切片

- (1) 脱蜡与水化: 将切片样本依次放入二甲苯 I (10 min) → 二甲苯 II (10 min) → 100%乙醇 I (5 min) → 100%乙醇 II (5 min) → 95%乙醇 (5 min) → 90%乙醇 (5 min) → 80%乙醇 (5 min) → 70%乙醇 (5 min) → ddH<sub>2</sub>O 冲洗 5 min, 冲洗 2 次。【注】: 二甲苯有毒, 易挥发, 请在通风橱中进行此操作。
- (2) 用滤纸吸干切片样本周围液体, 用免疫组化笔画好样本轮廓, 以便下游通透与标记。【注】: 若在后续实验操作中发现免疫组化笔画的轮廓圈被破坏, 需及时补画。
- (3) 通透: 按 1: 100 的比例, 将 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度 20 μg/mL, 在每个样本上滴加 100 μL, 使溶液覆盖全部样本区域, 20-37°C孵育 20 min。【注】: Proteinase K 可通透细胞膜和核膜, 从而使后续步骤的染色试剂充分进入细胞核进行反应, 提高标记效率。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载玻片上脱落的风险, 过短则可能造成透性处理不充分, 影响标记效率。为得到更好的结果, Proteinase K 的浓度、孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化。
- (4) PBS 漂洗切片 2 次, 每次 5 min, 用滤纸吸去多余的液体, 将处理好的样本放在湿盒中保持湿润。【注】: 这一步必须把 Proteinase K 洗涤干净, 否则会严重干扰后续的标记反应。
- (5) 转步骤 2. TUNEL 反应。



## 冰冻组织切片

- (1) 固定：取出冰冻切片，并回温至室温。加入适量 4%多聚甲醛（PBS 配制），室温固定 30 min。PBS 漂洗 2 次，每次 10 min。【注】：若是担心甲醛清洗不干净，影响最终染色效果。可在甲醛固定完成后加入适量 2 mg/mL 甘氨酸清洗 10 min，中和残留的固定液，再进行 PBS 清洗。
- (2) 用滤纸吸干切片样本周围液体，用免疫组化笔圈好样本轮廓，以便下游通透与标记。【注】：若在后续实验操作中发现免疫组化笔画的轮廓圈被破坏，需及时补画。
- (3) 通透：按 1: 100 的比例，将 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度 20  $\mu$ g/mL，在每个样本上滴加 100  $\mu$ L，使溶液覆盖全部样本区域，20-37°C 孵育 20 min。【注】：Proteinase K 可通透细胞膜和核膜，从而使后续步骤的染色试剂充分进入细胞核进行反应，提高标记效率。孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载玻片上脱落的风险，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。为得到更好的结果，Proteinase K 的浓度、孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化。
- (4) PBS 漂洗切片 2 次，每次 5 min，用滤纸吸去多余的液体，将处理好的样本放在湿盒中保持湿润。【注】：这一步必须把 Proteinase K 洗涤干净，否则会严重干扰后续的标记反应。
- (5) 转步骤 2. TUNEL 反应。

### 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 $\times$  DNase I Buffer 稀释成 1 $\times$  DNase I Buffer 备用。
- (2) 滴加 100  $\mu$ L 1 $\times$  DNase I Buffer 到已处理的样本上，覆盖全部样本区域，室温平衡 5 min。
- (3) 用 1 $\times$  DNase I Buffer 以 1: 100 稀释 DNase I (2 U/ $\mu$ L) 至终浓度 20 U/mL 的工作液。
- (4) 弃去 Buffer，加入 100  $\mu$ L 浓度为 20 U/mL 的 DNase I 工作液，室温孵育 10 min。
- (5) 弃去 DNase I 工作液，PBS 清洗 2 次。
- (6) 转步骤 2. TUNEL 反应。

## 2. TUNEL 反应

配制 TUNEL 反应液（即用即配）：

	1 个样本	5 个样本	10 个样本
TdT 酶	1 $\mu$ L	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Cy3 TUNEL Reaction Buffer	49 $\mu$ L	245 $\mu$ L	490 $\mu$ L
TUNEL 反应液总体积	50 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L

### 对于贴壁细胞、细胞涂片或组织切片

- (1) 每个样本加入 50  $\mu$ L TUNEL 反应液，使反应液均匀覆盖样本。37°C 避光孵育适宜的时间（细胞推荐染色时间 30min-1h，组织染色时间推荐 2h）。【注】：50  $\mu$ L TUNEL 反应液适合涂片、切片或 96 孔板（其他不同孔板可以适当调整 TUNEL 反应液体积，覆盖细胞即可）。如果待检测的样品为涂片、切片或在 24 孔板、12 孔板或 6 孔板中，可以使用防蒸发膜，或自行尝试使用自封袋或者其它适当材料自行裁剪成比孔略小的圆形塑料片，滴加 TUNEL 反应液后覆盖在样品上，可以防止 TUNEL 反应液蒸发，并且使 TUNEL 反应液均匀覆盖样本。



- (2) 弃去 TUNEL 反应液, PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min。【注】: 为了降低背景, PBS 漂洗切片 1 次后, 可再用 0.1% Triton X-100 (PBS 配制, 其中含 5 mg/mL BSA) 漂洗 3 次, 每次 5 min, 这样游离的未反应的标记物可以清除较干净。
- (3) (可选) 每个样本加入适量浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  的 DAPI 染液, 室温避光孵育 5 min。染色完成后, 弃去 DAPI 染液, PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min。
- (4) (可选) 切片封片: 将切片依次在纯水、70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇中浸没 5 min, 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 5 min。脱水完成后, 擦去切片周围的液体, 每个样本滴加 50  $\mu\text{L}$  抗荧光淬灭封片剂 (抗荧光淬灭封片剂可能会不适用于某些染料, 实验前建议进行预实验测试匹配性), 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。
- (5) 用滤纸吸去多余的液体, 向样本区域加 100  $\mu\text{L}$  PBS 保持样本湿润, 立即在荧光显微镜下观察。

#### 对于悬浮细胞或细胞悬液

- (1) 每个样本管加入 50  $\mu\text{L}$  TUNEL 反应液轻轻重悬细胞, 37°C 避光孵育 30~60 min。每隔 15 min 用微量移液器轻轻重悬细胞。
- (2) 2000 rpm 离心 5 min, 弃去 TUNEL 反应液, 加入适量 0.1% Triton X-100 (PBS 配制, 其中含 5 mg/mL BSA) 轻轻重悬细胞, 并清洗 2 次。
- (3) 每个样本管加入 100  $\mu\text{L}$  浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  的 DAPI 染液, 室温避光孵育 5 min。
- (4) 加入 400  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞, 立即用流式细胞仪检测或进行涂片后在荧光显微镜下观察。

#### 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. 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
3. 染色背景较重或非特异性着色明显时可适当减少染色时间。
4. 实验时建议增加阴性对照和阳性对照组。
5. 组分 A 使用时请佩戴口罩、手套, 如接触皮肤, 请立即用大量水冲洗。
6. 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
7. 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

EZ Trans 细胞转染试剂 (高效) (货号: AC04L092)  
快速细胞冻存液 (无血清、无蛋白) (货号: AC05L033)