

Biotin TUNEL 细胞凋亡试剂盒

Biotin TUNEL Apoptosis Kit



产品货号: T6068S, T6068L

产品规格: 20 T, 50 T

储存条件: -20°C保存, 有效期见外包装

产品内容:

组分 \ 规格	T6068S (20 T)	T6068L (50 T)
A. Biotin TUNEL Reaction Buffer	1 mL	2 × 1.25 mL
B. TdT Enzyme	40 μL	100 μL
C. Streptavidin-HRP	20 μL	50 μL
D. Streptavidin-HRP稀释液	1 mL	2 × 1.25 mL
E. DAB浓缩液 (20×)	50 μL	125 μL
F. DAB稀释液	1 mL	2 × 1.25 mL
G. 显色增强剂 (10×)	100 μL	250 μL
H. Proteinase K (2 mg/mL)	40 μL	100 μL
I. DNase I (2 U/μL)	5 μL	13 μL
J. 10×DNase I Buffer	100 μL	260 μL

注: (1) 组分 A、C、E、F 需避光保存。(2) 组分 B、C、H、I 请注意冰上操作。(3) 组分 F 避免反复冻融, 建议分装保存。(4) 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。

产品介绍

细胞发生凋亡时, 一些 DNA 内切酶被激活, 这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA, 产生 180 bp-200 bp 的 DNA 片段, 断裂的 DNA 片段暴露出大量的粘性 3'-OH 末端, 可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的催化作用下, 与生物素 (Biotin)-dUTP 结合, 随后和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 Streptavidin (Streptavidin-HRP) 结合, 最后在 HRP 的催化下通过 DAB 显色来显示凋亡细胞, 从而通过光学显微镜直接进行凋亡细胞的检测, 这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)。

本试剂盒应用范围广, 可用于检测冷冻或石蜡切片中的细胞凋亡情况, 也可检测培养的贴壁细胞或悬浮细胞的凋亡情况。可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。

使用方法

实验材料 (自备)

- PBS缓冲液 (1×, pH7.4)



UElancy Inc.

Tel:0512-88965152

Web:www.uelandy.com

- 0.4% Triton X-100 (PBS配制)
- 1% Triton X-100 (PBS配制)
- 石蜡切片处理相关试剂
- 4%多聚甲醛 (PBS配制)
- 免疫组化笔
- 3% H₂O₂ (甲醇: ddH₂O: H₂O₂=8:1:1; 新鲜配制)
- 中性树脂
- ddH₂O

实验设计

A. 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。

B. 阴性对照 (可选):

使用不含 TdT Enzyme 的 Biotin TUNEL Reaction Buffer, 用 ddH₂O 替代 TdT Enzyme。

C. 实验处理组。

D. 实验对照组。

实验步骤

1. 样本准备:

(1) 对于贴壁细胞或细胞涂片

a. 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。

b. 固定: 加入适量4%多聚甲醛 (PBS配制), 4°C固定30 min。PBS清洗2次。

c. 通透: 加入适量0.4% Triton X-100 (PBS配制), 室温通透20 min。PBS清洗2次。

d. 封闭: 每孔加入100 μL左右的3% H₂O₂溶液, 并使其充分覆盖细胞, 室温避光封闭20 min, 以灭活细胞内源的过氧化氢酶, 随后用PBS清洗2次。

e. 转步骤2. TUNEL 反应。

(2) 对于悬浮细胞或细胞悬液

a. 收集细胞 (3-5×10⁶个细胞), 1000 rpm离心5 min, PBS清洗2次。

b. 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。

c. 通透: 加入适量0.4% Triton X-100 (PBS配制), 室温通透20 min。2000 rpm离心5 min, PBS清洗2次。

d. 封闭: 每孔加入100 μL左右的3% H₂O₂溶液, 轻轻吹吸重悬细胞, 室温避光封闭20 min, 以灭活细胞内源的过氧化氢酶, 随后用PBS清洗2次。

e. 转步骤2. TUNEL 反应。

(3) 石蜡组织切片

a. 烘片: 将切片样本置于烘箱中, 60°C烘片1h。



UElandy Inc.

Tel:0512-88965152

Web:www.uelandy.com

b. 脱蜡与水化：将切片样本依次浸入二甲苯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）→ ddH₂O（5 min）→ PBS（5 min）。

注：二甲苯有毒，易挥发，请在通风橱中进行此操作。

c. 用滤纸吸干切片样本周围液体，用免疫组化笔画圈好样本轮廓，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。

d. 通透：按1: 50的比例，将2 mg/mL的Proteinase K溶液用PBS或ddH₂O稀释至终浓度40 μg/mL，在每个样本上滴加100 μL，使溶液覆盖全部样本区域，37°C孵育30 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。

e. PBS漂洗切片3次，每次5 min。

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。

f. 封闭：将切片样本浸入3% H₂O₂溶液中，室温（15-25 °C）封闭20min，以灭活切片内源的过氧化氢酶。

g. PBS漂洗切片3次，每次5 min，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。

h. 转步骤2. TUNEL 反应。

（4）冰冻组织切片

a. 固定：取出冰冻切片，并回温至室温（玻片上无水汽）。将切片样本浸入4%多聚甲醛（PBS配制）中，室温固定30 min。PBS缓慢漂洗3次，每次5min。

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。

b. 通透：将切片样本浸入1% Triton X-100（PBS配制）中，室温促渗5 min。

注：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。

c. PBS漂洗切片3次，每次5 min。

d. 封闭：将切片样本浸入3% H₂O₂溶液，室温孵育20 min，以灭活切片内源的过氧化氢酶。

e. PBS漂洗切片3次，每次5 min，用滤纸吸干切片样本周围液体，用免疫组化笔画圈好样本轮廓，以便下游标记。将处理好的切片放在湿盒中保持湿润。

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。

f. 转步骤2. TUNEL 反应。

（5）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）

a. 按1: 10的比例用ddH₂O将10×DNase I Buffer稀释成1×DNase I Buffer备用。

b. 滴加100 μL 1×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。

c. 用1×DNase I Buffer以1: 100稀释DNase I（2 U/μL）至终浓度20 U/mL的工作液。

d. 弃去Buffer，加入100 μL浓度为20 U/mL的DNase I工作液，室温或37°C处理15~30 min（仅供参考：细胞样本可以室温孵育



15 min; 切片样本可以37°C孵育30 min)。

e. 弃去DNase I工作液, PBS漂洗3次, 每次5 min。

f. 转步骤2. TUNEL 反应。

2. TUNEL 反应

(1) 配制TUNEL反应液(现配现用):

TUNEL 反应液配制	1 个样本	5 个样本	10 个样本
TdT 酶	2 μ L	10 μ L	20 μ L
Biotin TUNEL Reaction Buffer	48 μ L	240 μ L	480 μ L
总体积	50 μ L	250 μ L	500 μ L

(2) 每个样本加入50 μ L TUNEL 反应液, 使反应液均匀覆盖样本, 37°C孵育60 min。

注: 50 μ 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 反应液后覆盖在样本上, 可以防止 TUNEL 反应液蒸发, 并且使 TUNEL 反应液均匀覆盖样本。

(3) 弃去TUNEL反应液, PBS清洗1次, 再用PBS(含0.1% TritonX-100和5 mg/mL BSA)清洗3次。

3. Streptavidin-HRP 工作液和 DAB 显色液的配制

(1) Streptavidin-HRP工作液的配制(现配现用):

Streptavidin-HRP 工作液配制	1 个样本	5 个样本	10 个样本
Streptavidin-HRP	1 μ L	5 μ L	10 μ L
Streptavidin-HRP 稀释液	49 μ L	245 μ L	490 μ L
总体积	50 μ L	250 μ L	500 μ L

(2) DAB显色液的配制(现配现用):

DAB 显色液配制	1 个样本	5 个样本	10 个样本
DAB 浓缩液(20 \times)	2.5 μ L	12.5 μ L	25 μ L
DAB稀释液	47.5 μ L	237.5 μ L	475 μ L
总体积	50 μ L	250 μ L	500 μ L

注: 1) 不要使用含有叠氮化钠的缓冲液, 叠氮化钠是一种HRP抑制剂。

2) DAB 浓缩液(20 \times)/DAB稀释液必须完全融化混匀后使用。

3) 配制好的DAB显色液可在4°C避光稳定保存5天, 工作液内出现的任何沉淀均不影响染色。对于出现沉淀的工作液, 建议高速离心后取上清使用。

(3) DAB显色增强液的配制(现配现用):

DAB 显色增强液配制	1 个样本	5 个样本	10 个样本
显色增强剂(10 \times)	5 μ L	25 μ L	50 μ L
ddH ₂ O	45 μ L	225 μ L	450 μ L
总体积	50 μ L	250 μ L	500 μ L



注：显色增强剂（10×）必须完全混匀后使用。

4. 样品显色

（1）每个样本加入50 μL Streptavidin-HRP工作液，37°C避光孵育30 min。

注：50 μL Streptavidin-HRP工作液适合涂片、切片或96孔板（其他不同孔板可以适当调整Streptavidin-HRP工作液体积，覆盖细胞即可）。为防止Streptavidin-HRP工作液蒸发，建议在样本上覆上防蒸发膜。

（2）弃去Streptavidin-HRP工作液，PBS清洗3次。

（3）每个样本加入50 μL DAB显色液，室温避光孵育1~30 min或更长时间，孵育时间根据样本显色情况而定，若无背景出现则可继续孵育至显色达到预期深浅。

（4）去除DAB染色工作液，用ddH₂O/PBS冲洗样品3~5次以中止显色反应。

（5）（可选）DAB显色较浅时或需进一步增强信号时，可选显色增强步骤。

a. 最后一次洗涤完毕后，去除ddH₂O/PBS，加50 μL显色增强液，确保能充分覆盖样品。室温避光孵育1~30 min或更长时间，孵育时间根据样本显色情况而定，直至DAB在表位处产生的浅棕色沉淀变成深棕色沉淀且无明显非特异及背景着色。

b. 去除显色增强液，用ddH₂O/PBS冲洗样品3~5次以中止增强显色反应。

（6）（可选）切片样本：加入适量苏木素染色液或甲基绿染色液进行细胞核染色。弃去染色液PBS清洗2次。

（7）（可选）切片封片：每个样本滴加50 μL中性树脂，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。

（8）用滤纸吸去多余的液体，向样本区域加100 μL PBS保持样本湿润，立即在光学显微镜下分析样本。

注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
2. 叠氮化钠对HRP有抑制作用，实验中请勿使用含有叠氮化钠的试剂。
3. 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品和药品，不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

