

## Biotin TUNEL 细胞凋亡试剂盒

货号:C100001

规格: 20T/50T

产品内容:

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

**保存:** -20°C保存, 组分 A、E、F、G 需要避光保存, 避免反复冻融。有效期见外包装。

**产品介绍:**

细胞发生凋亡时, 会激活一些 DNA 内切酶, 这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA, 产生 180bp-200bp 的 DNA 片段, 表现为琼脂糖凝胶电泳中呈现的特异的梯状 Ladder 图谱。基因组 DNA 双链或单链断裂时会出现产生大量的粘性 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, 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 nick end labeling, TUNEL)。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂, 因而没有 3'-OH 形成, 很少能够被染色。TUNEL 法可以对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色, 能准确地反应细胞凋亡典型的生物化学和形态特征, 可检测出极少量的凋亡细胞, 因而在细胞凋亡的研究中广泛采用。

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):**

- 1×PBS 缓冲液 (pH~7.4)

- 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (甲醇: ddH<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=8:1:1 新鲜配制)
- 中性树脂
- ddH<sub>2</sub>O

### 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 ddH<sub>2</sub>O 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), 室温固定 30min。PBS 清洗 2 次。

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

d. 封闭: 每孔加入 100μL 左右的 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 (PBS 新鲜配制), 并使其充分覆盖细胞, 室温避光封闭 20min, 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 (3-5×10<sup>6</sup> 个细胞), 1000rpm 离心 5min, 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 30min。2000rpm 离心 5min, PBS 清洗 2 次。

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

d. 封闭: 每孔加入 100μL 左右的 3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 (PBS 新鲜配制), 轻轻吹吸重悬细胞, 室温避光封闭 20min, 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：将切片样品置于烘箱中，60°C烘片 1h。
- b. 脱蜡与水化：将切片样本依次放入二甲苯 I (10min) → 二甲苯 II (10min) → 100%乙醇 I (5min) → 100%乙醇 II (5min) → 95%乙醇 (5min) → 90%乙醇 (5min) → 80%乙醇 (5min) → 70%乙醇 (5min) → ddH<sub>2</sub>O 冲洗 5min → PBS (5min)。

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 2mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度 40μg/mL，在每个样本上滴加 100μL，使溶液覆盖全部样本区域，37°C 孵育 20min。

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波片上脱落的风险，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 5min。

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：加入适量 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 (PBS 新鲜配制)，室温 (15-25°C) 孵育 20min，以灭活细胞内源的过氧化氢酶。

- g. PBS 漂洗切片 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。

- 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)。加入适量 4% 多聚甲醛 (PBS 配制)，室温固 30min。PBS 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 2mg/mL 甘氨酸清洗 10min，中和残留的固定液，再进行 PBS 清洗。

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

注：孵育时间过长会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载波片上脱落的风险，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 5min。

- d. 封闭：加入适量 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 (PBS 新鲜配制)，室温孵育 20min，以灭活细胞内源的过氧化氢酶。

- e. PBS 漂洗切片 3 次，每次 5min，用滤纸吸去多余的液体，用免疫组化笔圈好样本轮廓，以便下游通透与标记。将处理好的样品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 ddH<sub>2</sub>O 将 10×DNase I Buffer 稀释成 1×DNase I Buffer 备用。

- b. 滴加 100μL 1×DNase I Buffer 到已处理的样本上，覆盖全部样本区域，室温平衡 5min。
- c. 用 1×DNase I Buffer 以 1: 100 稀释 DNase I(2U/μL)至终浓度 20U/mL 的工作液。
- d. 弃去 Buffer，加入 100μL 浓度为 20U/mL 的 DNase I 工作液，室温或 37°C 孵育 15-30min。（仅供参考：细胞样本可以室温孵育 15min；切片样本可以 37°C 孵育 30min）。
- e. 弃去 DNase I 工作液，PBS 清洗 2 次。
- f. 转步骤 2.TUNEL 反应。

## 2. TUNEL 反应

(1) 配制 TUNEL 反应液（即用即配）：

TUNEL 反应液配制 A	1 个样本	5 个样本	10 个样本
TdT 酶	1μl	5μl	10μl
Biotin TUNEL Reaction Buffer	48μl	240μl	480μl
总体积	50μl	250μl	500μl

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

注：50μL 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。

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

## 3. Streptavidin-HRP 工作液盒 DAB 显色液的配制

(1) Streptavidin-HRP 工作液的配制（即用即配）

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

(2) DAB 显色液的配制(即用即配)

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

注意：

1. DAB 浓缩液 (20×) /DAB 稀释液必须完全融化混匀后使用。
2. 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。
3. 配制好的工作液可在 2~8°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（即用即配）

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×)	5μl	25μl	50μl
蒸馏水	45μl	225μl	450μl
总体积	50μl	250μl	500μl

注意：显色增强液 (10×) 必须完全混匀后使用。

#### 4. 样品显色：

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

注：50μl 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，建议在样本上覆盖防蒸发膜。

(2) 弃去 Streptavidin-HRP 工作液，PBS 清洗 3 次。

(3) 每个样本加入 50μl DAB 显色液，室温避光孵育 1~30min 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 ddH<sub>2</sub>O/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 ddH<sub>2</sub>O，加 50μl 显色增强液，确保能充分覆盖样品。室温避光孵育 1~30min 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性及背景着色。

b. 去除显色增强液，用 ddH<sub>2</sub>O/PBS 冲洗样品 3~5 次以中止显色反应。

(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 50μl 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，向样本区域加入 100μl PBS 以保持样本湿润，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. 组分 A、E、F、G 使用时请佩戴口罩、手套，如接触皮肤，请立即用大量水冲洗。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。