

产品说明书

产品名称: Biotin TUNEL Assay Apoptosis Detection Kit

产品货号: BN16068

产品规格: 20T, 50T

产品内容:

组分	20T	50T
A. Biotin TUNEL Reaction Buffer	2×0.5 mL	5×0.5 mL
B. TdT酶	20 μL	50 μL
C. Streptavidin-HRP	20μL	50μL
D. Streptavidin-HRP稀释液	1mL	2×1.25mL
E. DAB显色液A	100μL	250μL
F. DAB显色液B	1mL	2.5mL
G. DAB显色液C	50μL	125μL
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

储存条件

本产品应避光置于-20℃储存; TUNEL Reaction Buffer 避光储存于-20℃, 避免反复冻融。本产品推荐条件下可以储存 12 个月。

注: TUNEL EquiLibration Buffer、TUNEL Reaction Buffer 和 DAB 显色液中含有有毒、致癌成分 Sodium cacodylate trihydrate、Cobaltous chloride 以及 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), 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。

产品介绍

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 末端催化掺入生物素(Biotin)标记的 dUTP (Biotin-X-dUTP)。随后和辣根过氧化物酶(HRP)标记的 Streptavidin (Streptavidin-HRP)特异结合, 最后在 HRP 的催化下通过 DAB 显色来显示凋亡细胞, 从而可以通过普通光学显微镜观察并计数凋亡细胞。由于正常的或正在增值的细胞几乎没有 DNA 的断裂, 因而没有 3'-OH 形成, 很少能被染色。TUNEL 法可以选择性的对凋亡细胞直接进行原位检测, 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, 是一种更快速、直接的检测手段。

使用方法

实验材料(自备)

- PBS 缓冲液 (pH~7.4)
- 4% 多聚甲醛 in PBS
- 0.3% H₂O₂ in PBS (新鲜配制)

本产品仅用于科研

TEL: 010-62960866 www.biorigin.Ltd

- 70%乙醇（自选）
- 脱蜡溶剂（石蜡切片样本）

实验步骤

1. 样本准备:

1.1 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 清洗细胞两次。
- 3) 细胞固定: 加入适量 4%多聚甲醛(pH 7.4)溶液, 4℃ 放置 30 min。
- 4) PBS 清洗细胞两次。
- 5) 通透细胞: 加入冰上预冷的 70%乙醇, 在-20℃孵育 4 h。细胞能在 70%乙醇中-20℃的条件下保存一周。或者细胞可用配制于 PBS 中的 0.2% Triton X-100 溶液通透, 室温放置 20 min。
- 6) PBS 清洗细胞两次。
- 7) 封闭细胞: 每孔加入 100 μ L 左右的配制于 PBS 中的 0.3 % H_2O_2 溶液, 轻敲孔板使其充分覆盖细胞, 室温避光封闭 30 min, 用 1 \times PBS 清洗细胞 2 次;

1.2 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 5 min, 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 5 min。
- 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 5 min。
- 4) 室温下, 将切片浸没于纯水中漂洗 1 次, 每次 3 min, 再将切片浸没于 1 \times PBS 中漂洗 1 次, 每次 3 min, 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 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 1 \times

PBS 稀释, 使其终浓度为 20 μ g/mL。每个样本上滴加 100 μ L 稀释好的 Proteinase K 溶液, 使溶液覆盖全部样本区域, 室温孵育 20 min。(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 10~30 min, 4 μ m 左右的片子可以用 10 min, 但 30 μ m 左右的可用 30 min。过长易脱片、过短起不到通透效果。

7) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min。

8) 封闭: 加入适量配制于 PBS 中的 0.3% H_2O_2 溶液（新鲜配制), 室温孵育 30 min, 以灭活切片内源的过氧化氢酶。

9) PBS 浸润清洗切片两次, 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。

1.3 冰冻切片

- 1) 将冰冻切片放置于室温的片架上, 室温 20 min, 晾干。
- 2) 将载玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液 (in PBS) 中, 室温固定 30 min。
- 3) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min。
- 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 2 mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 1 \times PBS 稀释, 使其终浓度为 20 μ g/mL。每个样本上滴加 100 μ L 稀释好的 Proteinase K 溶液, 使溶液覆盖全部样本区域, 室温孵育 10 min。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 10~30 min, 4 μ m 左右的片子可以用 10 min, 但 30 μ m 左右的可用 30 min。过长易脱片、过短起不到通透效果。
- 6) PBS 浸润清洗切片两次, 每次 5 min。
- 6) 封闭: 加入适量配制于 PBS 中的 0.3% H_2O_2 溶液（新鲜配制), 室温孵育 30 min, 以灭活切片内源的过氧化氢酶。
- 7) PBS 清洗样品 3 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。

1.4 阳性处理(仅阳性对照进行此步骤, 其他样品直接进行

工作液总体积			
--------	--	--	--

TUNEL 反应步骤)

- 1) 按 1:10 的比例用 diH₂O 将 10 × DNase I Buffer 稀释成 1 × DNase I Buffer 备用。
- 2) 滴加 100 μL 1 × DNase I Buffer 到已通透的样本上，室温平衡 5 min。
- 3) 用 1 × DNase I Buffer 以 1:100 稀释 DNase I (2 U/μL)，使其为终浓度 20 U/mL 的工作液。
- 4) 轻轻吸掉多余液体，加入 100 μL 浓度为 20 U/mL DNase I 工作液，室温孵育 10 min。
- 5) 轻轻吸掉多余液体，PBS 清洗样品 2 次。

2. TUNEL 反应

1) 配制 TUNEL 反应液 (即用即配)。

	1 个样品	5 个样品	10 个样品
TdT 酶	1μL	5μL	10μL
Biotin TUNEL Reaction Buffer	49μL	245μL	490μL
TUNEL 反应液总体积	50μL	250μL	500μL

2) 每个样品加入 50 μL TUNEL 反应液，37°C 避光孵育 60 min，组织样本需要 2 h (阴性对照样品加入不含 TdT 酶的 TUNEL 反应液)。

注：50μL TUNEL 反应液适合涂片、切片或 96 孔板、48 孔板、24 孔板或 12 孔板的一个孔，如果是 6 孔板中的一个孔 TUNEL 反应液建议使用 100μL。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，建议在滴加 TUNEL 反应液后在样品上覆上防蒸发膜，防止 TUNEL 反应液蒸发，并且使 TUNEL 反应液均匀覆盖样品。

3) PBS 清洗反应后的样品 3 次，每次 5 min。

3. Streptavidin-HRP 工作液和 DAB 显色液的配制

1) Streptavidin-HRP 工作液的配制 (即用即配)：

	1 个样品	5 个样品	10 个样品
Streptavidin-HRP	1μL	5μL	10μL
Streptavidin-HRP 稀释液	49μL	245μL	490μL
Streptavidin-HRP	50μL	250μL	500μL

2) DAB 显色液的配制 (即用即配)：

	1 个样品	5 个样品	10 个样品
DAB 显色液 A	5μL	25μL	50μL
DAB 显色液 B	42.5μL	212.5μL	425μL
DAB 显色液 C	2.5μL	12.5μL	25μL
DAB 显色液总体积	50μL	250μL	500μL

4. 样品显色

1) 向样品滴加 50μL Streptavidin-HRP 工作液，37°C 避光孵育 30min。

注：50μL Streptavidin-HRP 工作液适合涂片、切片或 96 孔板、48 孔板、24 孔板或 12 孔板的一个孔，如果是 6 孔板中的一个孔 Streptavidin-HRP 工作液，建议使用 100μL。如果待检测的样品为切片、涂片或在 24 孔板、12 孔板或 6 孔板中，建议在滴加 Streptavidin-HRP 工作液后在样品上覆上防蒸发膜，防止 Streptavidin-HRP 工作液蒸发，并且使 Streptavidin-HRP 工作液均匀覆盖样品。

2) PBS 清洗反应后的样品 3 次，每次 5 min。

3) 向样品滴加 50μL DAB 显色液，室温孵育 5-30 min 或在显微镜下根据颜色的发展情况掌握染色时间。

注：如果显色很强可短于 5min 即停止显色，如果显色很弱，可以适当延长显色时间，甚至显色过夜。

4) PBS 清洗反应后的样品 3 次，每次 5 min。

5) 选做(本步骤可以不做)：用苏木素染色液或甲基绿染色液进行细胞核染色。随后用 PBS 清洗 3 次。

6) 直接光学显微镜下观察、拍照，或用 95%乙醇脱水 5min，再用 100% 乙醇脱水 2 次，每次约 3min，再用二甲苯透明 2 次，每次 5min，随后封片观察，光学显微镜下拍照。

注意事项：

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
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。

常见问题与分析

现象	可能原因	建议
非特异性染色	有些细胞或组织的核酸酶或聚合酶的酶活性水平较高	取细胞或组织后立即固定并且要充分固定
	TdT 酶反应时间过长或Tunel反应过程中反应液渗漏, 细胞或组织表面不能保持湿润。	控制反应时间, 并确保TdT 酶能很好地覆盖样品。
	使用了不适当的固定液, 例如一些酸性固定液	采用推荐的固定液
标记率低	如果以乙醇或甲醇固定的样品则标记效率较低(因为在固定时染色质未能与蛋白质交联, 而在操作中丢失)	采用推荐的固定液
	固定时间过长, 导致交联程度过高	减少固定时间
	贴壁细胞如果使用药物诱导凋亡, 会使发生凋亡细胞的贴壁性会减弱	在凋亡诱导结束后, 可以对多孔板进行1000g离心5min, 然后再吸出培养基并用PBS洗涤。如果没有适合的离心机, 请注意操作轻缓, 防止发生凋亡的细胞在洗涤时被洗去。后续整个操作也需要轻缓
染色背景很高	支原体污染	使用支原体染色检测试剂盒检测是否为支原体污染
	TdT 酶反应时间过长	注意控制反应时间
	高速分裂和增殖的细胞, 有时也会出现细胞核中的DNA 断裂	在非高增殖期取样检测
	DAB 孵育时间过长	减少DAB 染色时间
	Biotin-X-dUTP 的非特异性结合	在TdT 酶反应之后, 再用含0.1% Triton X-100 和1 mg/ml BSA 的PBS 洗三次。