

## Biotin TUNEL 细胞凋亡试剂盒

货号:AC17699

规格: 20T/50T

产品内容:

| 规格<br>组分                        | 20T   | 50T      |
|---------------------------------|-------|----------|
| A: Biotin TUNEL Reaction Buffer | 1mL   | 2×1.25mL |
| B: TdT Enzyme                   | 20μL  | 50μL     |
| 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   | 2×1.25mL |
| G:DAB显色液C                       | 50μL  | 125μL    |
| H: Proteinase K (2mg/mL)        | 40μL  | 100μL    |
| I: DNase I (2U/μL)              | 5μL   | 13μL     |
| J: 10×DNase I Buffer            | 100μL | 260μL    |

**保存:** -20℃保存, 组分A、E、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):**

- 1xPBS 缓冲液 (pH~7.4)
- 0.2% 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
- 0.3% $H_2O_2$  (PBS 新鲜配制)
- 石蜡切片处理相关试剂
- 中性树脂
- dd $H_2O$

### 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 dd $H_2O$  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 0.2% Triton X-100 (PBS 配制), 室温通透 20min。PBS 清洗 2 次。

d. 封闭: 每孔加入 100 $\mu$ L 左右的 0.3% $H_2O_2$  溶液 (PBS 新鲜配制), 并使其充分覆盖细胞, 室温避光封闭 30min, 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 $\times 10^6$  个细胞), 1000rpm 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 $^{\circ}$ C 固定 30min。2000rpm 离心 5 min, PBS 清洗 2 次。

c. 通透: 加入适量 0.2% Triton X-100 (PBS 配制), 室温通透 20min。2000rpm 离心 5 min, PBS 清洗 2 次。

d. 封闭: 每孔加入 100 $\mu$ L 左右的 0.3% $H_2O_2$  溶液 (PBS 新鲜配制), 轻轻吹吸重悬细胞, 室温避光封闭 30min, 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. 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。

b. 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。

c. 通透: 按 1: 100 的比例, 将 2mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度 20μg/mL, 在每个样本上滴加 100μL, 使溶液覆盖全部样本区域, 20-37°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。

d. PBS 漂洗切片 2 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。

e. 封闭: 加入适量 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 (PBS 新鲜配制), 室温孵育 30min, 以灭活细胞内源的过氧化氢酶。

f. 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。

g. 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。加入适量 4% 多聚甲醛 (PBS 配制), 室温固定 30min。

PBS 漂洗 2 次, 每次 10min。

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 10 min, 中和残留的固定液, 再进行 PBS 清洗。

b. 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。

c. 通透: 按 1: 100 的比例, 将 2mg/mL 的 Proteinase K 溶液用 PBS 稀释至终浓度 20μg/mL, 在每个样本上滴加 100μL, 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。

d. PBS 漂洗切片 2 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。

e. 封闭: 加入适量 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 (PBS 新鲜配制), 室温孵育 30min, 以灭活细胞内源的过氧化氢酶。

f. 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。

g. 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 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。
- c. 用 1 $\times$ DNase I Buffer 以 1: 100 稀释 DNase I (2U/ $\mu$ L)至终浓度 20U/mL 的工作液。
- d. 弃去 Buffer，加入 100 $\mu$ L 浓度为 20U/mL 的 DNase I 工作液，室温孵育 10 min。
- 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）：

|                              | 1 个样本      | 5 个样本       | 10 个样本      |
|------------------------------|------------|-------------|-------------|
| TdT 酶                        | 1 $\mu$ l  | 5 $\mu$ l   | 10 $\mu$ l  |
| Biotin 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 |

(2) 每个样本加入 50 $\mu$ L TUNEL 反应液，使反应液均匀覆盖样本。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60min。

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他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 2 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）

|                         | 1 个样本      | 5 个样本       | 10 个样本      |
|-------------------------|------------|-------------|-------------|
| Streptavidin-HRP        | 1 $\mu$ l  | 5 $\mu$ l   | 10 $\mu$ l  |
| Streptavidin-HRP 稀释液    | 49 $\mu$ l | 245 $\mu$ l | 490 $\mu$ l |
| Streptavidin-HRP 工作液总体积 | 50 $\mu$ l | 250 $\mu$ l | 500 $\mu$ l |

(2) DAB 显色液的配制(即用即配)

|            | 1 个样本        | 5 个样本         | 10 个样本      |
|------------|--------------|---------------|-------------|
| DAB 显色液 A  | 5 $\mu$ l    | 25 $\mu$ l    | 50 $\mu$ l  |
| DAB 显色液 B  | 42.5 $\mu$ l | 212.5 $\mu$ l | 425 $\mu$ l |
| DAB 显色液 C  | 2.5 $\mu$ l  | 12.5 $\mu$ l  | 25 $\mu$ l  |
| DAB 显色液总体积 | 50 $\mu$ l   | 250 $\mu$ l   | 500 $\mu$ l |

## 4. 样品显色：

(1) 每个样本加入 50 $\mu$ L Streptavidin-HRP 工作液，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

注：50 $\mu$ L 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，建议再样本上覆上防蒸发膜。

(2) 弃去Streptavidin-HRP工作液，PBS清洗2次。

(3) 每个样本加入50 $\mu$ l DAB显色液，室温孵育5min或在显微镜下根据显色情况控制染色时间。

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) 弃去DAB显色液，PBS清洗2次。

(5) (可选) 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。

(6) (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5min，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5min。脱水完成后，擦去切片周围的液体，每个样本滴加50 $\mu$ l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。

(7) 用滤纸吸去多余的液体，向样本区域加入100 $\mu$ l 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. 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。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。