



## Biotin 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。

### 订购信息

产品名称	货号	规格
Biotin TUNEL Assay Apoptosis Detection Kit	AC12L082	20T
Biotin TUNEL Assay Apoptosis Detection Kit	AC12L083	50T

### 产品组分

组分	AC12L082 (20T)	AC12L083 (50T)
A. Biotin TUNEL Reaction Buffer	2*0.5 mL	5*0.5 mL
B. TdT酶	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L
C. Streptavidin-HRP	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L
D. Streptavidin-HRP稀释液	1 mL	2*1.25 mL
E. DAB显色液A	100 $\mu$ L	250 $\mu$ L
F. DAB显色液B	1 mL	2.5 mL
G. DAB显色液C	50 $\mu$ L	125 $\mu$ L
H. Proteinase K (2 mg/mL)	40 $\mu$ L	100 $\mu$ L
I. DNase I (2 U/ $\mu$ L)	5 $\mu$ L	13 $\mu$ L
J. 10 $\times$ DNase I Buffer	100 $\mu$ L	260 $\mu$ L

### 运输与保存

蓝冰运输。-20 $^{\circ}$ C避光保存; 组分 A、E、G 需避光保存, 避免反复冻融。有效期见外包装。【注】: 组分 A、E、F、G 使用时请佩戴口罩、手套, 接触皮肤, 请立即用大量水冲洗。

### 实验材料 (自备)

- PBS 缓冲液 (pH $\sim$ 7.4)
- 4% 多聚甲醛 in PBS



0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS (新鲜配制)

70%乙醇 (自选)

脱蜡溶剂 (石蜡切片样本)

## 使用方法

### 1. 样本准备:

#### 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 2 次。
- (3) 细胞固定: 加入适量 4%多聚甲醛(pH 7.4)溶液, 4°C 放置 30 min。
- (4) PBS 清洗细胞 2 次。
- (5) 通透细胞: 加入冰上预冷的 70%乙醇, 在-20°C孵育 4 h。细胞能在 70%乙醇中-20°C的条件下保存 1 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 2 次。
- (7) 封闭细胞: 每孔加入 100μL 左右的配制于 PBS 中的 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液, 轻敲孔板使其充分覆盖细胞, 室温避光封闭 30 min, 用 1×PBS 清洗细胞 2 次。

#### 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×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 × PBS 稀释, 使其终浓度为 20 μg/mL。每个样本上滴加 100 μL 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 μm 左右的片子可以用 10 min, 但 30 μm 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 2 次, 每次 5 min。
- (8) 封闭: 加入适量配制于 PBS 中的 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 2 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。

#### 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 2 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 × PBS 稀释, 使其终浓度为 20 μg/mL。每个样本上滴加 100 μL 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 μm 左右的片子可以用 10 min, 但 30 μm 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 2 次, 每次 5 min。
- (7) 封闭: 加入适量配制于 PBS 中的 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。
- (8) 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。

#### 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 diH<sub>2</sub>O 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 工作液总体积	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
DBA 显色液 A	5 $\mu$ L	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L
DBA 显色液 B	42.5 $\mu$ L	212.5 $\mu$ L	425 $\mu$ L
DBA 显色液 C	2.5 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L	25 $\mu$ L
DBA 显色液总体积	50 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L

#### 4. 样品显色:

- (1) 向样品滴加 50  $\mu$ L Streptavidin-HRP 工作液, 37°C 避光孵育 30 min。【注】: 50  $\mu$ L 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, 建议使用 100  $\mu$ L。为防止 Streptavidin-HRP 工作液蒸发, 建议在样品上覆上防蒸发膜。
- (2) PBS 清洗样品 3 次, 每次 5 min。
- (3) 向样品滴加 50  $\mu$ L 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 5 min 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 清洗样品 3 次, 每次 5 min。
- (5) 选做: 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。针对石蜡切片, 如果需要封片, 使用 95%乙醇脱水 5 min, 再用 100%乙醇脱水 2 次, 每次 3 min, 再用二甲苯透明 2 次, 每次 5 min。

#### 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. 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. 非特异性染色、标记率低、染色背景很高等常见问题与分析可在官网查阅。

#### 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)