

biotin-TUNEL 细胞凋亡试剂盒

货号: B0068

存储条件: 本产品应置于-20°C储存, 组分 A、E、G 需避光, 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。

产品组分:

	(20T)	(50T)
A.Biotin TUNEL Reaction Buffer	1 mL	2×1.25 mL
B.TdT 酶	40 μL	100 μL
C.Streptavidin-HRP	20 μL	50 μL
D.Streptavidin-HRP 稀释液	1 mL	2×1.25 mL
E. 20* DAB solution	50 μL	125 μL
F. Stabilized Peroxide Buffer	1 mL	2×1.25 mL
G. 10×Chromogenic Enhancer	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

产品简介:

细胞凋亡的一个显著特点是细胞染色体 DNA 的降解, 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 180bp-200bp 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 (1×, pH7.4)

0.4% Triton X-100 (PBS 配制)

0.1% Triton X-100 (PBS 配制, 其中含 5 mg/mLBSA)

4%多聚甲醛 (PBS 配制)

免疫组化笔

脱蜡溶剂 (石蜡切片样本)、石蜡切片处理相关试剂

抗荧光淬灭封片剂

30% H₂O₂

无水甲醇

中性树脂

ddH₂O

2. 仪器准备: 光学显微镜

注意事项:

- 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
- 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。
- 所有酶类组份对温度敏感, 需全程冰上操作, 避免反复冻融, 建议首次使用时按需分装, -20 °C 避光保存。
- TUNEL 反应液、Streptavidin-HRP 工作液、DAB 显色液均需现配现用。
- DAB 具有潜在致癌性, 全程需在通风橱中操作, 佩戴手套、口罩与护目镜, 避免直接接触皮肤、黏膜或吸入。
- 内源性过氧化物酶封闭需充分, 否则会导致高背景显色; H₂O₂ 溶液需新鲜配制, 避免失效。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请遵循您所在常规实验室安全规定。

实验步骤

方案一: 悬浮细胞

1. 收集与洗涤细胞:

- 收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。
- 1000 rpm, 室温离心 5 min, 小心吸弃上清液。

2. 细胞重悬与计数:



(1) 使用PBS重悬并细胞计数。

(2) 取 $3\sim 5 \times 10^6$ 个细胞，1000 rpm低速离心5 min，去除PBS。

(3) 使用100 μ L PBS重悬。1000 rpm低速离心5 min，去除上清。

注：显微镜法对细胞密度要求不严格，只要实验组与对照组密度一致即可。

可。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整，以显微镜下视野中细胞分布清晰可辨为宜。

3. 固定：

(1) 加入适量4%多聚甲醛（PBS配制）充分重悬细胞，4 $^{\circ}$ C固定30min。2000 rpm离心5 min，PBS清洗2次。

4. 通透：

(1) 加入适量0.4% TritonX-100（PBS配制），室温通透20 min。2000 rpm离心5 min，PBS清洗2次。

5. 内源性过氧化物酶封闭：

(1) 每个样品加入100 μ L左右的3% H_2O_2 溶液（甲醇：ddH₂O： $H_2O_2=8:1:1$ ；新鲜配制），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。

6. 转步骤三、TUNEL 反应。

方案二：贴壁细胞或细胞爬片

1. 细胞处理：

(1) 提前一天在孔板中接种细胞，使得细胞汇合度达到70%~85%，待细胞贴壁后按照实验设计处理细胞。

2. 细胞清洗：

(1) 直接在培养板中吸弃细胞培养液。
(2) 根据培养板规格，加入对应体积的PBS轻柔洗涤细胞一次（例如：96孔板加100 μ L/孔，48孔板加150 μ L/孔，24孔板加250 μ L/孔，12孔板加500 μ L/孔，6孔板加1 mL/孔）。洗涤后吸净PBS。

注：如果细胞贴得不牢，可以干燥样品使细胞贴得更牢。

3. 固定：

(1) 加入适量4%多聚甲醛（PBS配制）充分重悬细胞，4 $^{\circ}$ C固定30 min。2000 rpm离心5 min，PBS清洗2次。

4. 通透：

(1) 加入适量0.4% TritonX-100（PBS配制），室温通透20 min。2000 rpm离心5 min，PBS清洗2次。

5. 内源性过氧化物酶封闭：

(1) 每个样品加入100 μ L左右的3% H_2O_2 溶液（甲醇：ddH₂O： $H_2O_2=8:1:1$ ；新鲜配制），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。

6. 转步骤三、TUNEL 反应。

V20260410

方案三：石蜡切片

1. 烘片：

(1) 将石蜡切片置于切片架上，放置于60 $^{\circ}$ C烘箱中烤片60 min。

2. 脱蜡与水化：

(1) 二甲苯中脱蜡10 min。换用新鲜的二甲苯，再脱蜡10 min。无水乙醇5 min。95%乙醇5 min。90%乙醇5 min。70%乙醇5 min，ddH₂O冲洗5 min，冲洗2次。

(2) 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：二甲苯有毒，易挥发，请在通风橱中进行此操作。

3. 通透：

(1) 按1:50的比例，将2 mg/mL的组分C(Proteinase K)溶液用PBS稀释至终浓度40 μ g/mL，在每个样本上滴加100 μ L，使溶液覆盖全部样本区域，37 $^{\circ}$ C孵育30 min。

注：组分C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，组分C的浓度、孵育时间、温度需根据不同类型组织样本进行优化。

4. 洗涤：

(1) 将切片样本浸入PBS漂洗三次，每次5 min，用滤纸吸去多余的液体，将处理好的样本放在湿盒中保持湿润。用流式细胞仪在预设的检测通道下进行分析。

注：这一步必须把组分C洗涤干净，否则会严重干扰后续的标记反应。

5. 内源性过氧化物酶封闭：

(1) 每个样品加入100 μ L左右的3% H_2O_2 溶液（甲醇：ddH₂O： $H_2O_2=8:1:1$ ；新鲜配制），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。

6. 转步骤三、TUNEL 反应。

方案四：冷冻切片

1. 固定：

(1) 固定：取出冰冻切片，并回温至室温。将切片样本浸入4%多聚甲醛（PBS配制）中，室温固定30 min。将切片样本浸入PBS漂洗三次，每次10 min。

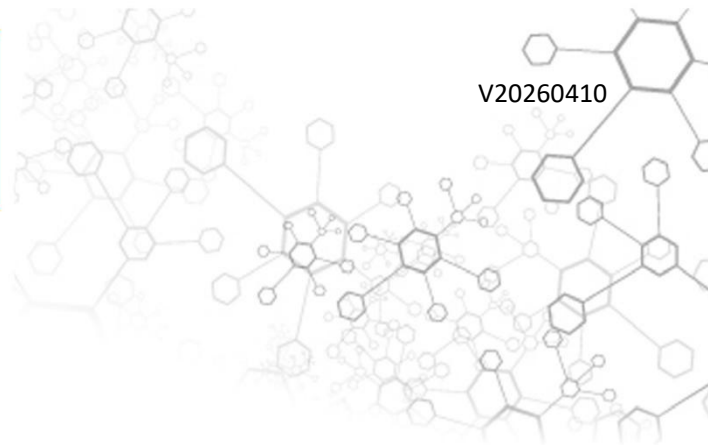
注：若担心甲醛清洗不干净，影响最终染色效果。可在甲醛固定完成后加入适量2 mg/mL 甘氨酸清洗10 min，中和残留的固定液，再进行PBS清洗。



(2) 用滤纸吸干切片样本周围液体，用免疫组化笔画好样本轮廓，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。

V20260410



2. 通透:

- (1) 按1:50的比例,将2 mg/mL的组分C溶液用PBS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:组分C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,组分C(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。

3. 洗涤:

- (1) 将切片样本浸入PBS漂洗三次,每次5 min,用滤纸吸去多余的液体,将处理好的样本放在湿盒中保持湿润。用流式细胞仪在预设的检测通道下进行分析。

注:这一步必须把组分C洗涤干净,否则会严重干扰后续的标记反应。

4. 内源性过氧化物酶封闭:

- (1) 每个样品加入100 μL左右的3% H₂O₂溶液(甲醇:ddH₂O:H₂O₂=8:1:1;新鲜配制),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物酶,随后用PBS清洗2次。

5. 转步骤三、TUNEL 反应。

方案五:阳性处理

- (1) 按1:10的比例用ddH₂O将组分J(10×DNase I Buffer)稀释成1×DNase I Buffer备用。
- (2) 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。
- (3) 用1×DNase I Buffer以1:100稀释组分I(DNase I (2 U/μL))至终浓度20 U/mL的工作液。
- (4) 弃去Buffer,加入100 μL浓度为20 U/mL的DNase I工作液,室温孵育15 min,孵育时长可根据不同的样本类型进行灵活调整,调整区间为15~30 min。

注:细胞样本可以室温孵育15 min;切片样本可以37°C孵育30 min

- (5) 弃去DNase I工作液,PBS清洗2次。

注:仅阳性对照组进行阳性处理操作,其他样品均直接转步骤三、TUNEL 反应。

转步骤三、TUNEL反应。

TUNEL 反应:

1. 配制 TUNEL 反应液:

- (1) 现配现用,冰上轻柔混匀,按下表体系配制,阴性对照仅加入不含组分B(TdT Enzyme)的组分A(Biotin TUNEL Reaction Buffer)。

TUNEL 反应液 配制	1 个样 本	5 个样 本	10 个样 本	50 个样 本	100 个 样本
组分 B	2 μL	10 μL	20 μL	100 μL	200 μL
组分 A	48 μL	240 μL	480 μL	2.4 mL	4.80 mL
TUNEL 反应液 总体积	50 μL	250 μL	500 μL	2.5 mL	5 mL

注:反应液混匀时需避免产生气泡,气泡会导致样本局部未被标记。

2. 对于贴壁细胞、细胞涂片或组织切片:

- (2) 在样品上加50 μL TUNEL反应液,37 °C避光孵育60 min,孵育时长可根据不同的样本类型进行灵活调整,调整区间为60~120 min。

注:50 μL TUNEL 检测液适合涂片、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 检测液建议使用100 μL。

注: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 检测液后覆盖在样品上,可以防止TUNEL 检测液蒸发,并且使TUNEL 检测液均匀覆盖样品。自行裁剪圆片时需要连着圆片突出一个角或连着一边,并将圆形之外的突出部分折叠,方便染色结束后利用突出部分顺利取出圆片。也可以用免疫组化笔圈出一个区域进行染色。孵育时需注意在多余的孔和多孔板的空隙中加入适量水以保持湿润,从而尽量减少TUNEL 检测液的蒸发。

注:孵育时长可根据不同的样本类型进行调整,细胞样品建议孵育时间在60 min,组织切片样品建议孵育时间120 min。

- (3) 弃去TUNEL反应液,PBS清洗2次后,再用0.1% TritonX-100(PBS配制,其中含5 mg/mL BSA)清洗3次,每次5 min,使游离的未反应标记物清除干净。



3.对于悬浮细胞或细胞悬液

- (1) 每个样本管加入50 μ L TUNEL反应液轻轻重悬细胞, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。每隔10 min用微量移液器轻轻重悬细胞。

注: 孵育时长可根据不同的细胞类型进行灵活调整, 调整区间为15~30 min。

- (2) 2000 rpm离心5 min, 弃去TUNEL反应液, 用0.1% TritonX-100 (PBS配制, 其中含5 mg/mLBSA) 清洗2次, 每次5 min, 使游离的未反应标记物清除干净。

4.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	50 个样本	100 个样本
组分 C(Streptavidin-HRP)	1 μ L	5 μ L	10 μ L	50 μ L	100 μ L
组分 D(Streptavidin-HRP Buffer)	49 μ L	245 μ L	490 μ L	2.45 mL	4.9 mL
Streptavidin-HRP 工作液总体积	50 μ L	250 μ L	500 μ L	2.5 mL	5 mL

注: Streptavidin-HRP 工作液配制时需要冰上操作, 轻柔混匀, 避免剧烈震荡。

- (1) DAB显色液配制 (现配现用) :

按顺序加入各组分, 3%的 H₂O₂ 现配现用 (PBS 稀释)

DAB 显色液配制	1 个样本	5 个样本	10 个样本	50 个样本	100 个样本
组分 E(20 \times DAB Solution)	2.5 μ L	12.5 μ L	25 μ L	125 μ L	250 μ L
组分 F(Stabilized Peroxide Buffer)	44 μ L	220 μ L	440 μ L	2.2 mL	4.4 mL
3% H ₂ O ₂	3.5 μ L	17.5 μ L	35 μ L	175 μ L	350 μ L
总体积	50 μ L	250 μ L	500 μ L	2.5 mL	5 mL

注: 稀释 H₂O₂ 时使用不含叠氮化钠的缓冲液否则会对 HRP 产生抑制作用。

注: 组分 E 使用前确保完全融化并充分混匀。

- (2) DAB显色增强液配制 (现配现用) :

DAB 显色增强液配 制	1 个样本	5 个样本	10 个样本	50 个样本	100 个样本
组分 G (10 \times Chromogenic Enhancer)	5 μ L	25 μ L	50 μ L	250 μ L	500 μ L
ddH ₂ O	45 μ L	225 μ L	450 μ L	2.25 mL	4.5 mL
总体积	50 μ L	250 μ L	500 μ L	2.5 mL	5 mL

注: DAB 显色增强液配制时需全程避光, 在通风橱内进行操作。

5.样品显色

- (1) HRP孵育: 每个样本滴加50 μ L Streptavidin-HRP工作液, 加盖防蒸发膜, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。

注: 如果使用 6 孔板样本, 建议加 Streptavidin-HRP 工作液 100 μ L, 其他不同孔板可以适当调整 Streptavidin-HRP 工作液体积, 能够完全覆盖细胞即可。

- (1) 洗涤: 吸弃Streptavidin-HRP工作液, 用PBS洗涤3次, 每次5 min。
(2) DAB显色: 每个样本滴加50 μ L DAB显色液, 室温避光孵育5 min。

注: 孵育过程中需在显微镜下实时观察显色情况, 当凋亡细胞出现清晰的棕色/棕褐色沉淀、背景无明显着色时, 立即终止显色, 不同样品的显色时间可以根据显色情况进行灵活调整, 调整区间为 1~30 min。

- (3) 终止显色: 吸弃 DAB 显色液, 用 PBS 洗涤样本 3 次, 每次 5 min, 终止显色反应
(4) 显色增强 (可选) : DAB 显色较浅或需进一步增强信号时可进行此操作
(5) 每个样本滴加 50 μ L DAB 显色液, 室温避光孵育 5 min。去除显色增强液, 用 PBS 冲洗样品 3 次, 每次 3 min, 中止增强显色反应。
(6) 核复染 (可选) : 滴加苏木素染色液或甲基绿染色液, 室温孵育 3~5min, PBS 洗涤样本 3 次, 每次 3min。
(7) 脱水透明与封片 (石蜡切片样品可选) : 切片依次浸入 95%乙醇脱水 5 min \rightarrow 100%乙醇脱水 2 次, 每次 3 min \rightarrow 二甲苯透明 2 次, 每次 5 min; 滴加中性树脂, 加盖盖玻片, 轻柔去除气泡完成封片。
(8) 用滤纸吸去多余的液体, 向样本区域加 100 μ L PBS 保持样本湿润, 立即在光学显微镜下分析样本。





兰博利德 LABLEAD
高新技术企业

V20260410

