

一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(DAB 显色法)

DAB(SA-HRP) Tunel Cell Apoptosis Detection Kit

使用说明书

◆货号及规格:

目录编号	包装规格
C215-01	50T
C215-02	100T

◆产品组成:

组分编号	组分名称	C215-01(50T)	C215-02(100T)
C215-1	Recombinant TdT Enzyme	50uL	2*50uL
C215-2	Biotin-dUTP Labeling Mix	250uL	2*250uL
C215-3	Equilibration Buffer	5*1mL	10*1mL
C215-4	Streptavidin-HRP	25uL	2*25uL
C215-5	Proteinase K(200µg/mL)	1mL	2*1mL

◆**储存条件:** 4°C运输, -20°C 保存, 有效期一年。

◆**产品概述:** 细胞凋亡中染色体 DNA 的断裂是个渐进的阶段性过程。染色体 DNA 首先在内源性的核酸水解酶的作用下降解为 50-300kb 的大片段, 然后大约 30%的染色体 DNA 在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶作用下, 在核小体单位之间被随机切断, 形成 180-200bp 核小体 DNA 多聚体。因此在细胞凋亡晚期, DNA 会被降解为 180-200bp 的片段, 断裂的基因组 DNA 上暴露出大量的 3'-OH 末端。末端脱氧核糖核苷酸转移酶 (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase/TdT)是一种不依赖于模板的 DNA 聚合酶, 可以催化脱氧核苷酸结合到断裂的 DNA 分子 3'-OH 末端。因此 TUNEL(TdT mediated dUTP Nick End Labeling)细胞凋亡检测试剂盒可以用来检测组织细胞在凋亡晚期过程中细胞核 DNA 的断裂情况。其原理是在 TdT 酶的作用下, 在基因组 DNA 断裂时暴露出的 3'-OH 末端掺入生物素标记的 dUTP(Biotin-dUTP), 随后用辣根过氧化物酶 (Horse-radish peroxidase/HRP) 标记的链霉亲和素 (Streptavidin)(Streptavidin-HRP/SA-HRP), 检测被生物素(Biotin)标记的 DNA 末端, 最

后通过加入 HRP 的底物混合液(DAB)进行显色反应, 使得凋亡细胞的细胞核被染成棕黄色, 从而可以用普通光学显微镜检测。本试剂盒应用范围广, 适用于石蜡组织切片, 冰冻组织切片、细胞爬片、细胞涂片等的细胞凋亡检测。

◆使用方法:

一、实验前准备

1. PBS 磷酸盐缓冲液(货号: C511)。
2. 固定液: 溶于 PBS 或其他缓冲体系的 4%多聚甲醛(货号: M329)。
3. 破膜液: 0.1%-0.5% Triton X-100(货号: M392)。
4. 双氧水封闭液: 3% H₂O₂, 用 PBS 配制。
5. 如需染核, 需自备苏木素染液(货号: M312)、苏木素分化液(货号: M417)、苏木素返蓝液(货号: M418)。
6. 自备 DAB 显色试剂(货号: M318)、正丁醇、二甲苯、中性树胶(货号: M401)等。
7. 操作时请穿实验服, 佩戴一次性手套。

二、样品准备

1. 石蜡包埋组织切片

- 1) 室温下将石蜡组织切片放入环保型脱蜡透明液(货号: M416)中浸泡 5-10min, 重复 2-3 次; 然后无水乙醇浸泡 5min, 重复 2 次; 最后用梯度乙醇(85%、75%、双蒸水)各浸泡 1 次, 每次 5min。
- 2) 用 PBS 轻轻润洗切片, 并去掉样本周围多余液体; 使用组化笔沿组织外围轮廓画一个与组织间隔 2-3mm 的小圈, 便于下游通透性处理和平衡标记操作; 在实验过程中, 切勿让样品干燥, 处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。
- 3) 配制 Proteinase K 工作液: 按 1: 9 的比例, 用 PBS 作为稀释液来稀释 Proteinase K(200μg/mL)原液, 使其终浓度为 20μg/mL。
- 4) 每个样本上滴加 100μL 上述 Proteinase K 工作液, 使其被全部覆盖, 37°C 孵育 20min。

注: Proteinase K 处理主要有助于组织和细胞后续步骤的染色试剂通透, 其孵育时间过长过短都会影响后续标记效率, 为得到更好的结果, 可以优化 Proteinase K 孵育的时间。

- 5) 用 PBS 溶液浸润清洗样本 3 次, 每次 5min(Proteinase K 需洗涤干净, 否则会干扰后续的标记反应), 处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

- 6) 可选步骤：去掉样本上多余的液体，将适量破膜液滴加到组织上，充分浸润组织，室温处理 20min；破膜处理完成后同样的用 PBS 溶液润洗样本 3 次，每次 5min；处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。
- 7) 去掉样本上多余的液体，将适量 3%的 H₂O₂(PBS 配制)滴加到组织上，充分浸润组织，室温处理 20 min(灭活组织内源的过氧化物酶，孵育时间不宜过长，否则会出现过氧化氢导致的 DNA 断裂，从而产生假阳性)；然后使用 PBS 溶液润洗样本 3 次，每次 5 min；处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

2. 组织冰冻切片

- 1) 将玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液(溶于 PBS)中固定，室温下孵育 10-15min。
- 2) 片子从固定液中取出后，通风橱中自然晾干。
- 3) 将玻片放入纯水或 PBS 中润洗，去掉玻片上残存的固定液。
- 4) 用组化笔沿着组织外围轮廓画一个与组织间隔 2-3mm 的小圈，便于下游通透性处理和平衡标记操作；在实验过程中，切勿让样品干燥，处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。
- 5) 配制 Proteinase K 工作液：按 1：9 的比例，用 PBS 作为稀释液来稀释 Proteinase K(200μg/mL)原液，使其终浓度为 20μg/mL。
- 6) 每个样本上滴加 100μL 上述 Proteinase K 工作液，使其被全部覆盖，室温孵育 10min。

注：Proteinase K 处理主要有助于组织和细胞后续步骤的染色试剂通透，其孵育时间过长过短都会影响后续标记效率，未得到更好的结果，可能需要优化 Proteinase K 孵育的时间。

- 7) 用 PBS 溶液润洗样本 2-3 次，去掉多余液体(Proteinase K 需洗涤干净，否则会干扰后续的标记反应)，处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。
- 8) 可选步骤：将适量破膜液滴加到组织上，充分浸润组织，室温处理 20min，破膜处理完成后同样的用 PBS 溶液润洗样本，去掉多余液体，处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。
- 9) 去掉样本上多余的液体，将适量 3%的 H₂O₂(PBS 配制)滴加到组织上，充分浸润组织，室温处理 20 min(灭活组织内源的过氧化物酶，孵育时间不易过长，否则会出现过氧化氢导致的 DNA 断裂，从而产生假阳性)；然后使用 PBS 溶液润洗样本 3 次，每次 5 min；处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

3. 细胞爬片

- 1) 在 Lab-Tek 腔室载玻片小室上培养贴壁细胞，在凋亡诱导处理之后，用 PBS 轻轻润洗 2 遍载玻片。
- 2) 向每个腔室载玻片小室中加入适量的 4%多聚甲醛溶液(溶于 PBS)固定，室温下孵育 20min。
- 3) 去掉固定液，加入 PBS 清洗 3 次，每次 5min。
- 4) 每个样本浸于破膜液中，室温孵育 5min 进行通透处理。

注意：推荐用 2-20 μ g/mL 的 Proteinase K 工作液消化，37 $^{\circ}$ C 处理 10min 左右，视细胞状态调整。若细胞易掉片则建议选择用破膜液处理。

- 5) 在盛有 PBS 溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本 2-3 次。
- 6) 向每个载玻片小室中加入适量的 3%的 H₂O₂(PBS 配制)，室温处理 20 min。
- 7) 轻轻去掉多余液体，加入 PBS 清洗 3 次，每次 5 min；并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体，处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

4. 细胞涂片

- 1) 以约 2 \times 10⁷个细胞/mL 的浓度将细胞重悬于 PBS 中，吸取 50-100 μ L 细胞悬液滴于防脱玻片上，使用一片洁净的载玻片轻柔涂开细胞悬液。
- 2) 将玻片浸入装有 4%新鲜配制于 PBS 中的多聚甲醛的染色缸中，固定细胞，在 4 $^{\circ}$ C 放置 25min。
- 3) 将玻片浸入 PBS 中，室温放置 5min 浸洗，重复一次。
- 4) 每个样本浸于破膜液中，室温孵育 5min 进行通透处理。

注意：推荐用 2-20 μ g/mL 的 Proteinase K 工作液消化，37 $^{\circ}$ C 处理 10min 左右，视细胞状态调整。若细胞易掉片则建议选择用破膜液处理。

- 5) 在盛有 PBS 溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本 2-3 次。
- 6) 每个样本加入适量的 3%的 H₂O₂(PBS 配制)，室温处理 20 min。
- 7) 轻轻去掉多余液体，加入 PBS 清洗 3 次，每次 5 min；最后用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体，处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

三、DNase I 处理阳性对照实验(可选步骤)：在样本通透处理后，用 DNase I(货号：M327)处理样本来准备阳性对照。

1. 将 100 μ L 1 \times DNase I Buffer(配制方法：取 10 μ L 10 \times DNase I Buffer，然后加入 90 μ L 去离子水混匀)滴加到已通透的样本上，室温孵育 5min。
2. 轻轻去掉多余液体，加入 100 μ L 含有 DNase I(20U/mL)的工作液(配制方法 取 10 μ L 10 \times DNase I Buffer，然后加入 2 μ L DNase I，再加入 88 μ L 去离子水混匀)，室温孵育 10min。

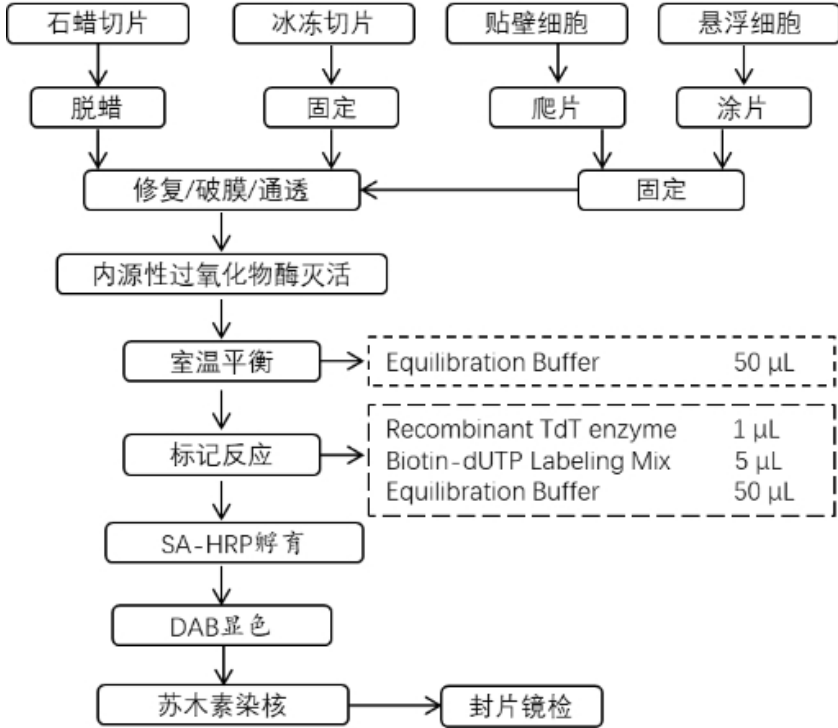
3. 轻轻去掉多余的液体，并将载玻片在装有 PBS 的染色缸中彻底洗 3-4 次。

注：阳性对照载玻片必须使用单独的染色缸，否则阳性对照载玻片上残留的 DNase I 可能会在实验载玻片上引入高背景。

四、标记与检测

1. **平衡：**每个样本滴加 50 μ L Equilibration Buffer 使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 10min。
2. **标记液配制：**在冰上解冻 Biotin-dUTP Labeling Mix 和 Equilibration Buffer，并按照 Recombinant TdT enzyme: Biotin-dUTP Labeling Mix: Equilibration Buffer=1 μ L: 5 μ L: 50 μ L(1: 5: 50)比例混合足够用于所有实验的 TdT 孵育缓冲液，具体实验使用试剂的体积可以根据玻片的大小进行适当等比例调整。
3. **阴性对照体系：**准备一份不含 Recombinant TdT enzyme 的对照 TdT 孵育缓冲液，用 ddH₂O 替代。
4. **标记：**尽量去掉平衡的 Equilibration Buffer，然后在每份组织样本上加入 56 μ L TdT 孵育缓冲液，在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h；注意不能干片，载玻片要避光。
5. 立即用 PBS 润洗组织样本，清洗 4 次，每次 5min。
6. 用滤纸轻轻擦掉样本周围的 PBS 溶液。
7. **Streptavidin-HRP 反应：**甩干玻片后，每个样本组织滴加 100 μ L(浸润组织)Streptavidin-HRP 反应液(Streptavidin-HRP: TBST=1: 200-500 比例提前稀释)，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。
8. PBS 清洗样本，清洗 3 次，每次 5min。
9. **DAB 显色：**配制 DAB 显色工作液(现配现用)(货号: M318)。每个样本滴加 50-100 μ L DAB 显色工作液，将切片置于显微镜下实时观察显色情况，待阳性显现后立即将片子放置湿盒中，用纯水清洗终止反应。
10. **苏木素染核：**切片浸入在苏木素染液(货号: M312)染色 3-5min，立即用纯水洗涤，经苏木素分化液(货号: M417)分化约 2S，立即纯水洗涤，然后经苏木素返蓝液(货号: M418)返蓝数秒，纯水洗涤干净(染核完成后需在显微镜下进行镜检，如染色过深，则回到分化液再次分化；如果染色偏浅，则从苏木素染核开始重新染色即可)。
11. **透明：**样本经 4 次新鲜无水乙醇进行脱水，每次 5min；经正丁醇中浸泡 5min，放入二甲苯中透明 5min，更换新鲜二甲苯再次透明 5min。
12. **封片：**使用中性树脂胶(货号: M401)对切片封片，自然晾干或 60 $^{\circ}$ C 烘箱烘干。
13. **镜检：**样本使用白光显微镜进行镜检(发生凋亡的阳性细胞核被染成棕黄色，正常的阴性细胞核被染成蓝色)。

五、实验流程简图



◆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. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用，不得用于临床诊断和药品等用途。

=====

