

BiotinTUNELAssayApoptosisDetectionKit

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 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。

订购信息:

产品名称	货号	规格	价格
BiotinTUNELAssayApoptosisDetectionKit	YL0039-1	20T	1880
BiotinTUNELAssayApoptosisDetectionKit	YL0039-2	50T	3480

产品组分:

组分	20T	50T
A. BiotinTUNELReactionBuffer	2×0.5mL	5×0.5mL
B. TdT 酶	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	2.5mL
G. DAB 显色液 C	50μL	125μL
H. ProteinaseK(2mg/mL)	40μL	100μL
I. DNaseI(2U/μL)	5μL	13μL
J. 10×DNaseI Buffer	100μL	260μL

运输与保存:

蓝冰运输。-20℃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~7.4)

4%多聚甲醛 inPBS

0.3%H₂O₂ inPBS(新鲜配制)

70%乙醇(自选)

脱蜡溶剂(石蜡切片样本)

操作步骤:

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(pH7.4)溶液,4℃放置 30min。

- (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℃孵育 4h。细胞能在 70%乙醇中-20℃的条件下保存 1 周。或者细胞可用配制于 PBS 中的 0.2%TritonX-100 溶液通透，室温放置 20min。
- (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%H₂O₂ 溶液，轻敲孔板使其充分覆盖细胞，室温避光封闭 30min，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 5min，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 5min。
- (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 5min。
- (4) 室温下，将切片浸没于纯水中漂洗 1 次，每次 3min，再将切片浸没于 1×PBS 中漂洗 1 次，每次 3min，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 2mg/mL 的 ProteinaseK 溶液用 1×PBS 稀释，使其终浓度为 20μg/mL。每个样本上滴加 100μL 稀释好的 ProteinaseK 溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 20min（ProteinaseK 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 10~30min，4μm 左右的片子可以用 10min，但 30μm 左右的可用 30min。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 5min。
- (8) 封闭：加入适量配制于 PBS 中的 0.3%H₂O₂ 溶液（新鲜配制），室温孵育 30min，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 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。

冰冻切片：

- (1) 将冰冻切片放置于室温的片架上，室温 20min，晾干。
- (2) 将载玻片浸没在 4%多聚甲醛溶液（inPBS）中，室温固定 30min。
- (3) PBS 浸润清洗切片 2 次，每次 5min。
- (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 2mg/mL 的 ProteinaseK 溶液用 1×PBS 稀释，使其终浓度为 20μg/mL。每个样本上滴加 100μL 稀释好的 ProteinaseK 溶液，使溶液覆盖全部样本区域，室温孵育 10min（ProteinaseK 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 10~30min，4μm 左右的片子可以用 10min，但 30μm 左右的可用 30min。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 5min。
- (7) 封闭：加入适量配制于 PBS 中的 0.3%H₂O₂ 溶液（新鲜配制），室温孵育 30min，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 diH₂O 将 10×DNaseI Buffer 稀释成 1×DNaseI Buffer 备用。
- (2) 滴加 100μL 1×DNaseI Buffer 到已通透的样本上，室温平衡 5min。
- (3) 用 1×DNaseI Buffer 以 1:100 稀释 DNaseI(2U/μL)，使其为终浓度 20U/mL 的工作液。
- (4) 轻轻吸掉多余液体，加入 100μL 浓度为 20U/mL DNaseI 工作液，室温孵育 10min。
- (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
BiotinTUNELReactionBuffer	49μL	245μL	490μL
TUNEL 反应液总体积	50μL	250μL	500μL

- (2) 每个样品加入 50μL TUNEL 反应液，37℃避光孵育 60min，组织样本需要 2h（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 5min。

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	1 μ L	5 μ L	10 μ L
Streptavidin-HRP 稀释液	49 μ L	245 μ L	490 μ L
Streptavidin-HRP 工作液总体积	50 μ L	250 μ L	500 μ L

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. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 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
		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	在非高增值期取样检测
	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%TritonX-100 和 1 mg/mlBSA 的 PBS 洗三次。

相关产品推荐:

细胞转染试剂（高效）。货号：(YL0026)

无血清细胞冻存液。货号：(YH0027)