天净沙系列

CAT#:250607-7

低温运输，-20℃保存

天净沙

细胞 TUNEL 试剂盒（Biotin-HRP-DAB 法）

Cell TUNEL Kit（Biotin-HRP-DAB）

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品为基于 TdT 生物素标记和 HRP-DAB 检测的 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒。TUNEL 即 TdT dUTP Nick-End Labeling，其原理是基因组 DNA 断裂时，暴露的 3'-OH 可以在末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)的催化下加上生物素标记的 dUTP，经过 SA-HRP 信号放大和显色后，可以通过显微镜观察调亡细胞。它具有以下特点：

1. 即开即用，用户不需要单独优化实验条件。
2. 高灵敏度，可以在单细胞水平检测到细胞凋亡。
3. 由于细胞一旦凋亡就有 DNA 断裂，故可以检测到早期的细胞凋亡。
4. 基于 TdT 加尾法，更容易标记凋亡细胞而非坏死细胞。
5. 起始材料是培养细胞。如果样本是组织切片则需选用另一款产品（250607-2）。
6. 本产品足够 20 个细胞样本的 TUNEL 实验。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用 11 孔盒包装

成分	编号	规格	包装
5×TdT 反应液	220745b	500 μL	0.5 mL 绿盖管
TdT 酶	220745a	25 μL	0.5 mL 红盖管
TUNEL 底物液	250607-2d	25 μL	0.5 mL 黄盖管
双氧水	CAS7722-84-1	300 μL	0.5 mL 白盖管
100×SA-HRP 浓缩液	28-P22629-hrp	10 μL	0.5 mL 紫盖管
1×DAB 溶解液	220753c-2	1 mL	1.5 mL 本色管
DAB 干粉	CAS7411-49-6	1 mg	0.5 mL 棕色管
DAB 增强剂	220753d	50 μL	0.5 mL 本色管
使用手册	250607sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备物品

多聚赖氨酸、PBS、TX-PBS（含 0.2% Triton X-100 的 PBS）、2×SSC。

使用流程

一、玻璃载片的预处理

1. 如果一次实验要测试 N 个样本，则需要准备 N+2 样本，多出的一个是凋亡阴性对照（NC，无任何药物诱导细胞凋亡），另一个是凋亡阳性对照（PC，用相关药物诱导细胞凋亡）。
2. 用自选常规方法对 N+2 张干净的玻璃载片进行多聚赖氨酸包被。然后将 PBS 洗涤后的细胞悬液铺在载片上，在培养箱里放置 15 分钟，然后进行固定。也可以

直接在多聚赖氨酸（不含保存剂）包被的载片上进行细胞培养，用 PBS 洗涤两次后进行固定。

3. 固定：在 Coplin 盒中用 4%多聚甲醛或 10%中性福尔马林室温固定 25 分钟。
4. 浸入 PBS 中，室温放置 5 分钟。重复此操作 1 次。
5. 浸入 TX-PBS 中，室温放置 5 分钟。
6. 浸入 PBS 中，室温放置 5 分钟。
7. 重复上步操作 1 次，然后进入第 10 步。

二、载片的 TdT 标记

8. 在每张载片上滴加 40 μL PBS 和 10 μL 5×TdT 反应液，室温孵育 15 分钟（等待期间可以进行下步的操作）。孵育结束后覆盖液体的处理按第 10 步进行。
9. 在微量离心管中按下表新鲜配制 TUNEL 标记液。该溶液必须现配现用，没用完的不必保留。N+2 块载片所需量按 N+3 配制：

成分	标记液
自备超纯水	38 μL×(N+3)
TUNEL 底物液	1 μL×(N+3)
5×TdT 反应液	10 μL×(N+3)
TdT 酶	1 μL×(N+3)

10. 用滤纸放在载片边缘（不要碰触载片）小心吸走第 8 步加入到载片上的液体，吸走后马上加入标记液，盖上塑料盖片使液体均匀分布（不能使用玻璃盖片），然后再如法处理下一张载片。
11. 将所有放湿盒中 37℃孵育 60 分钟。
12. 移除盖片，将载片放入自备 2×SSC 中浸泡 10 分钟。
13. 用 PBS 洗涤载片 3 次，每次 5 分钟。此步可充分去除未标记底物，避免其对后续反应的干扰。此时间不能缩短。

四、载片的显色

14. 将载片浸入到新鲜配制的双氧水工作液中，室温孵育 5 分钟。双氧水工作液配制方法是将双氧水按 1:100 的体积比加入到 PBS 中混匀即可。
15. 用 PBS 洗涤三次，每次 5 分钟。
16. 在载片上滴加 50 μL 新鲜配制的 SA-HRP 工作液，室温孵育 20 分钟。SA-HRP 工作液配制方法是将试剂盒提供的 100×SA-HRP 浓缩液按 1:100 的体积比跟 PBS 混合，轻柔混匀即可。本试剂盒提供的 100×SA-HRP 浓缩液足够配制 1

mL SA-HRP 工作液，足够 20 张载片使用。

17. 用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。

18. 新鲜配制 DAB 溶液。在装有 DAB 干粉的棕色管中，加入 1 mL DAB 溶解液，盖上盖子后颠倒 20 次溶解。再按每张载片需要 50 μL DAB 显色液的比例计算所需 DAB 显色液体积，并按下表配制（下表以配制 1 mL 为例，用户如需要配制其他体积，可按比例增减各成分用量）：

成份	加入量
DAB 溶液	990 μL
DAB 增强剂	10 μL
双氧水	1 μL

19. 将 50 μL 上步配制的 DAB 显色液滴加在每张载片上，室温避光放置 10 分钟。

20. 浸在超纯水中数次，空气中干燥后按常规操作封片并在显微镜下检测或照相。

关联产品

切片 TUNEL 试剂盒（DIG-AP-BCIP 法）