



TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书（简化版）

（G001-3 显色法 冰冻切片专用）

一、检测原理

细胞在发生凋亡时，会激活一些 DNA 内切酶，这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA。细胞凋亡时抽提 DNA 进行电泳检测，可以发现 180-200bp 的 DNA ladder。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(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase,TdT)的催化下加上生物素(Biotin)标记的 dUTP(Biotin-dUTP)，随后和辣根过氧化物酶(HRP)标记的 Streptavidin (Streptavidin-HRP)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检测到凋亡的细胞；由于正常的或正在增殖的细胞几乎没 DNA 的断裂，因而没有 3'-OH 形成，很少能够被标记。

二、试剂盒组成

组 份	G001-3-1 20T	G001-3-2 50T	储存条件
平衡液	1.0 ml	2.5 ml	-20℃
TdT 酶	80μl	200μl	-20℃
Streptavidin-HRP	10μl	25μl	4℃避光
Biotin-dUTP	20μl	50μl	-20℃
DAB	2mg	5mg	-20℃避光

三、自备仪器和试剂

多聚甲醛、甲醇、乙醇、PBS、H₂O₂、TritonX-100、柠檬酸钠、复染染液：苏木素或甲基绿等；盖玻片、载玻片、染色缸、染色湿盒、光学显微镜、37℃孵箱、移液器等。

四、样本处理及试剂准备

详见试剂盒说明书。

五、标记和显色反应：

- 1、预处理好的样本PBS漂洗2次，每次5min后，样本周围用滤纸或吸水纸吸干。
- 2、配制TdT酶反应液：

	1个样品	5个样品	10个样品
平衡液	45μl	225μl	450μl
Biotin-dUTP	1μl	5μl	10μl
TdT 酶	4μl	20μl	40μl
TdT 酶反应液总体积	50μl	250μl	500μl

- 3、每个样本滴加50μl TdT酶反应液，加盖玻片37℃避光湿润反应60min。
- 4、把第3步处理好的样本浸入PBS漂洗3次，每次5min。
- 5、Streptavidin-HRP及DAB工作液的配制：

**Streptavidin-HRP工作液的配制：**

	1个样品	5个样品	10个样品
Streptavidin-HRP	0.5 μ l	2.5 μ l	5 μ l
PBS	99.5 μ l	497.5 μ l	995 μ l
Streptavidin-HRP 工作液总体积	100 μ l	500 μ l	1000 μ l

DAB工作液的配制：

a、先把试剂盒中 DAB 粉末用 PBS 溶解配制成 20 $\times$ DAB（10 mg/ml）：

DAB	2mg	5mg	10mg
PBS	0.2ml	0.5ml	1.0ml
配制成 20 $\times$ DAB（10 mg/ml），放于-20 $^{\circ}$ C 保存			

b、DAB 工作液的配制：

	1个样品	5个样品	10个样品
20 $\times$ DAB（10 mg/ml）	5 μ l	25 μ l	50 μ l
30% H_2O_2	1 μ l	5 μ l	10 μ l
PBS	94 μ l	470 μ l	940
DAB 工作液总体积	100 μ l	500 μ l	1000 μ l

- 6、将第5步处理好的样本周围用滤纸或吸水纸吸干，再滴加50 μ l Streptavidin-HRP工作液，加盖玻片37 $^{\circ}$ C湿润避光反应30min。
- 7、把第6步处理好的样本浸入PBS漂洗3次，每次5min，样本周围用滤纸或吸水纸吸干。
- 8、将第7步处理好的样本滴加50 μ l-100 μ l DAB工作液，室温孵育5-30分钟或根据显色情况孵育适当时间。
- 9、把第8步处理好的样本浸入PBS漂洗3次，每次5min，可直接光学显微镜下观察、拍照。
- 10、选做(本步骤可不做)：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漂洗3次，每次5min，光学显微镜下观察、拍照。