



TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书（简化版）

（货号：G001-4 显色法 细胞样本专用）

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有 DNA 的断裂，因而没有 3'-OH 形成，很少能够被标记。

二、试剂组成

组 份	20T	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℃避光
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。（阴性对照片不加 TdT 酶）

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：

①、先把试剂盒中 DAB 粉末用 PBS 溶解配制成 20 $\times$ DAB（10 mg/ml），配制方法如下：

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			

②、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 $\sim$ 100 μ l DAB 工作液，室温孵育 5 $\sim$ 30 分钟或根据显色情况孵育适当时间。注意：如果显色很强可以短于 5 分钟即停止显色，如果显色很弱，可以适当延长显色时间，甚至显色过夜。
- 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(本步骤可不作)：用苏木素染色液或甲基绿染色液进行细胞核染色后用光学显微镜下观察、拍照。