



# TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒说明书（简化版）

（G002-1 荧光及显色法 通用型）

## 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)的催化下加上荧光素(FITC)标记的 dUTP(fluorescein-dUTP)，从而可以通过荧光显微镜检测；同时荧光素亦可被抗荧光素抗体(anti-fluorescein antibody)标记，在辣根过氧化物酶底物二氨基联苯胺（DAB）的存在下，产生很强的颜色反应（呈棕色），因而在普通光学显微镜下即可观察和计数凋亡细胞。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、试剂盒组份

| 组 份                       | 20T    | 50T    | 储存条件    |
|---------------------------|--------|--------|---------|
| 平衡液                       | 1.0 ml | 2.5 ml | -20℃    |
| 荧光标记液                     | 20μl   | 50μl   | -20℃ 避光 |
| TdT 酶                     | 80μl   | 200μl  | -20℃    |
| 50×蛋白酶 K                  | 40μl   | 100μl  | -20℃    |
| anti-fluorescein antibody | 10μl   | 25μl   | -20℃ 避光 |
| DAB                       | 2mg    | 5mg    | -20℃ 避光 |

## 三、自备仪器和试剂

二甲苯、多聚甲醛、甲醇、乙醇、PBS、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、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、荧光显微镜、光学显微镜、37℃ 孵箱、移液器等。

## 四、检测样本的预处理：

详见试剂盒说明书。

## 五、标记反应：

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 |
| 荧光标记液       | 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、荧光显微镜下观察，可以使用的激发波长范围为 450-500nm，发射波长范围为



515-565nm(绿色荧光)。可进一步用 DAB 进行染色观察

6、Anti-fluorescein antibody 及 DAB 工作液的配制：

anti-fluorescein antibody 工作液的配制：

|                                     | 1个样品         | 5个样品          | 10个样品        |
|-------------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| anti-fluorescein antibody           | 0.5 $\mu$ l  | 2.5 $\mu$ l   | 5 $\mu$ l    |
| PBS                                 | 99.5 $\mu$ l | 497.5 $\mu$ l | 995 $\mu$ l  |
| anti-fluorescein antibody<br>工作液总体积 | 100 $\mu$ l  | 500 $\mu$ l   | 1000 $\mu$ 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)，配制方法如下：

|     |       |       |       |
|-----|-------|-------|-------|
| DAB | 2mg   | 5mg   | 10mg  |
| PBS | 0.2ml | 0.5ml | 1.0ml |

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 $\mu$ l   | 25 $\mu$ l  | 50 $\mu$ l   |
| 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 1 $\mu$ l   | 5 $\mu$ l   | 10 $\mu$ l   |
| PBS                               | 94 $\mu$ l  | 470 $\mu$ l | 940          |
| DAB 工作液总体积                        | 100 $\mu$ l | 500 $\mu$ l | 1000 $\mu$ l |

7、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 $\mu$ l-100 $\mu$ l anti-fluorescein antibody 工作液，加盖玻片 37 $^{\circ}$ C 湿润避光反应 30min。

8、把第 7 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。

9、将第 8 步处理好的样本滴加 50 $\mu$ l-100 $\mu$ l DAB 工作液，室温孵育 30s-5min 或根据显色情况孵育适当时间。

10、把第 9 步处理好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5min，可直接显微镜下观察、拍照。

11、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。随后用 PBS 漂洗 3 次，每次 5min，显微镜下观察、拍照。