



TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒使用说明书（简化版）

（G002-3 荧光及显色法，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

试剂组份	20T 规格	50T 规格	储存条件
R1：平衡液	1.0 ml	2.5 ml	-20℃
R2：荧光标记液	20μl	50μl	-20℃避光
R3：TdT 酶	80μl	200μl	-20℃
R4：anti-fluorescein antibody	10μl	25μl	-20℃避光
R5：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、荧光显微镜、光学显微镜、37℃孵箱、移液器等。

四、操作规程

1、对于冰冻切片的预处理

详见试剂盒说明书。

2、阳性对照及阴性对照的准备

详见试剂盒说明书。

3、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



荧光标记液	1 μ l	5 μ l	10 μ l
TdT 酶	4 μ l	20 μ l	40 μ l
TdT 酶反应液总体积	50 μ l	250 μ l	500 μ l

- 3、每个样本滴加 50 μ l 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、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 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），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 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 μ l
DAB 工作液总体积	100 μ l	500 μ l	1000 μ 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 μ l-100 μ l anti-fluorescein antibody 工作液，加盖玻片 37℃ 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 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。
- 10、把第 9 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。
- 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，光学显微镜下观察、拍照。