



TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒说明书（简化版）

（货号：G001-1 通用型，显色法）

一、试剂组成：

组 份	G001-1-1: 20T	G001-1-2: 50T	储存条件
平衡液	1.0 ml	2.5 ml	-20℃
TdT 酶	80μl	200μl	-20℃
50×蛋白酶 K	40μl	100μl	-20℃
Streptavidin-HRP	10μl	25μl	4℃避光
Biotin-dUTP	20μl	50μl	-20℃
DAB	2mg	5mg	-20℃避光

二、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

三、适用范围

适用于组织样本（石蜡包埋、冰冻和超薄切片）和细胞样本（细胞涂片）的凋亡原位检测。

四、自备试剂及耗材

二甲苯、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。

五、样本预处理及实际准备

详见试剂盒说明书。

六、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：

参考下表配制适当量的 TdT 酶反应液（根据需要按照比例放大），需充分混匀。

	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	50 μ l	250 μ l	500 μ l
-------------	------------	-------------	-------------

- 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）
- 把第 3 步处理好的样本浸入 PBS 漂洗 3 次，每次 5min。
- Streptavidin-HRP 及 DAB 工作液的配制：

Streptavidin-HRP工作液的配制：

参考下表配制适量的Streptavidin-HRP工作液，需充分混匀。

	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），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℃保存			

- b、参考下表配制适量的 DAB 工作液，需充分混匀。注意：配制好的 DAB 工作液必须次使用完毕，不宜冻存。

	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

- 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℃湿润避光反应 30min。
- 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。
- 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。**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。
- 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。