



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (DAB 显色法)

货号: R32560

规格: 20T, 50T, 100T

保存温度: -20℃ 保存, 有效期 12 个月。

产品内容:

细胞在发生凋亡时, 一些核酸内切酶会被激活, 开始切断核小体间的基因组 DNA, DNA 被切断后会产生缺口, 并暴露出 3'-OH 末端, 在末端脱氧核苷酸转移酶 (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 的催化下可以连接经过标记的 dUTP。因为正常的细胞几乎没有 DNA 的断裂, 所以针对 dUTP 进行检测即可判断待测细胞的凋亡状态, 这种方法也被称为 TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) 法检测细胞凋亡。

本产品是用生物素 (Biotin) 标记 dUTP, 并可与连接辣根过氧化酶的链霉亲和素 (Streptavidin-HRP) 特异结合, 在辣根过氧化酶底物二氨基联苯胺 (DAB) 的存在下, 产生很强的颜色反应 (深棕色), 通过观察颜色来特异准确地定位正在凋亡的细胞, 因此可以在普通显微镜下即可观察并计数凋亡细胞。

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

产品组成:

组分	20T	50T	100T
10×蛋白酶 K	200 ul	500 ul	1 ml
DNaseI (50 U/ul)	200 ul	500 ul	1 ml
DNaseI Buffer	200 ul	500 ul	1 ml
平衡液	1 ml	2.5 ml	5 ml
TdT 酶	80 μl	200 ul	400 ul
Biotin-dUTP	20 ul	50 ul	100 ul
Streptavidin-HRP	10 μl	25 ul	50 ul
DAB-A 溶液	150 μl	300 ul	600 ul



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

DAB-B 溶液	150 μ l	300 ul	600 ul
DAB-C 溶液	150 μ l	300 ul	600 ul

使用方法:

一. 样品处理:

(a) 细胞涂片或冷冻切片

1、将自然晾干的细胞样本（细胞涂片或爬片）或冷冻切片浸入盛有 4%多聚甲醛固定液的染色缸，室温（15-25℃）固定 20-30min。

2、样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。

3、配制 1%Triton X-100 通透液（例如往 99ml 的 1×PBS 溶液中加入 1 ml Triton X-100），混匀，即用即配。

4、样本片浸入通透液中，室温 3-5min；之后浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min；

(b) 石蜡切片

1、切片按常规方法进行脱蜡，60℃烘干 60min 后，二甲苯脱蜡 2 次，乙醇水合（100%，95%，80%，75%）每次 5min。

2、然后浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。

3、配制蛋白酶 K 工作液：计算好样本数量集中配制，每样本 90ul 1×PBS 加入 10ul 10×蛋白酶 K，即用即配。

4、每个组织切片上滴加 100ul 蛋白酶 K 工作液，37℃反应 30min。切片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min（注意：对于部分固定过久的样本可选用微波方法：将切片置于 pH6.0 柠檬酸盐缓冲液中，微波中高火 8min 后，取出降温）。

二. 封闭:

1、需自行配制 3%H₂O₂ 封闭液；例：80ml 甲醇加入 10ml H₂O 和 10ml H₂O₂（30%），即用即配。

2、样本片浸入封闭液中，室温（15-25℃）封闭 10min。

3、样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。

三. 制备阳性对照:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

1、根据样本类型不同，配置 100ul 含不同活性单位（U）的 DNase I 反应液，配方如下：

样本类型	细胞样本	冷冻切片	石蜡切片
U/ 100ul	1000U-2000U	2000 U-3000 U	3000U-5000U
DNaseI（50 U/ul）用量	20ul-40ul	40ul-60ul	60ul-100ul
DNaseI Buffer 用量	80ul-60ul	60ul-40ul	40ul-0ul

2、在一张样本上滴加 100ul 配制好的 DNase I 反应液，在室温~37℃处理 10-30min。

3、上述制备好的阳性对照浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。

注：阳性对照只针对实验体系进行设置对照，不需要每片制备。

四. 连接：

1、配制 TdT 酶反应液：计算好样本数量集中配制（不计算阴性对照）：每个样本需要 45ul 平衡液+ 1ul Biotin-dUTP + 4ul TdT 酶，即用即配。

2、样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50ul TdT 酶反应液，加盖玻片放入温盒中，37℃避光反应 60min（注：阴性对照样本不加 TdT 酶反应液）。

3、反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。

五. 标记：

1、配制 Streptavidin-HRP 工作液，计算好样本数量集中配制：每个样本需要 49.5ul 1×PBS 加入 0.5ul Streptavidin-HRP，即用即配，注意避光。

2、样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50ul Streptavidin-HRP 工作液，加盖玻片放入温盒中，37℃避光反应 30min。

3、反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。

六. 显色：

1、配制 DAB 工作液: 计算好样本数量集中配制，每个样本样本用量为：50ul 蒸馏水加入 2.5ul DAB -A 溶液，混匀后再加入 2.5ul DAB-B 溶液和 2.5ul DAB-C 溶液，即用即配。

2、样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50ul DAB 工作液，室温显色反应 30s~5min。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

3、显色后的样本片浸入 1×PBS 漂洗三次，每次 5min。

七. 复染:

苏木素、甲基绿等常规染液复染（自备试剂）：将样本上滴加苏木素染液，染色 30s~5min（请在显微镜下观察确定），蒸馏水冲洗干净后浸入 1% 盐酸甲醇溶液中分化 5s，立即用蒸馏水冲洗干净。分别用 70%、85%、95%、无水乙醇浸洗 5min，用二甲苯浸二次，每次 10min（细胞爬片或涂片可不经梯度乙醇和二甲苯浸润）。晾干后在切片上加中性树胶，加盖玻片，光学显微镜下观察拍照。

注意事项:

1、实验前可将各个样本用免疫组化笔进行标记，另外需要准备 2 张样本切片分别用于阳性对照和阴性对照制备并做好对应标记。

2、各个工作液最好根据计算好的样本数量集中配制，再分别滴加于各样本上，避免因每个样本单独配制而产生的试剂损耗，TdT 酶反应液如需短暂保存时，请置于冰上。

3、配制好的 DAB 工作液应为浅棕色，如颜色过深，请勿使用。

4、本产品仅限于专业人员科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。