



Tunel 试剂盒 (488/Cy3/DAB)

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)的催化下加上绿色 FITC 或 Alexa488/红色荧光探针 Cy3(Cyanine 3)标记的 dUTP, 从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测, 这就是 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法检测细胞凋亡的原理

试剂盒组成:

组 分	RC-01 (20 T)	RC-02 (50 T)	RC-03 (100 T)
荧光反应液 (白光 tunel 反应液)	1 ml	2.5 ml	5 ml
TdT 酶	20 μ l	50 μ l	100 μ l
Streptavidin-HRP(荧光无)	10 μ l(荧光无)	25 μ l(荧光无)	50 μ l(荧光无)

保存条件: -20 度

石蜡切片荧光 Tunel 实验流程

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
病理切片机	上海徕卡仪器有限公司	RM2235
组织摊片机	浙江省金华市华速科技有限公司	HS1125
烤箱	绍兴市苏珀仪器有限公司	303-ISB
载玻片	江苏世泰实验器材有限公司	188105
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212424C
微波炉	格兰仕微波炉电器有限公司	P70D20TL-P4



脱色摇床	SCIOLOGEN,LLC	SK-0180-E
涡旋混合器	江苏朗越	XH-C
移液枪	Dragon	YE6K809531/YE6L882023
组化笔	Gene tech	GT1001
倒置荧光显微镜	日本尼康	NIKON ECLIPSE CI-S
成像系统	日本尼康	NIKON DS-U3

2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	
PBS 缓冲液	菇创生物	RC035
20X 柠檬酸修复液 (PH6.0)	菇创生物	RC015
10*蛋白酶 K 储存液	菇创生物	
破膜液	菇创生物	
DAPI	菇创生物	
抗荧光淬灭封片剂	菇创生物	
Tunel 试剂盒	菇创生物	RC-012

二、石蜡切片荧光 tunel 实验步骤

- 1、石蜡切片脱蜡至水：**依次将切片放入二甲苯 I 15min-二甲苯 II 15min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min，取出置于通风厨内等酒精晾干后放入自来水中稍洗，蒸馏水洗。（冬天应提高脱蜡温度或适当延长脱蜡时间）

- 2、**通透**：PH6.0 柠檬酸修复液中火修复 8min，室温冷却，用免疫组化笔划圈，之后**纯水**洗三次(重要)。(通透方式有多种：1 蛋白酶消化，2 tritonx100 通透剂通透，柠檬酸修复)
- 3、**配试剂工作液以及孵育**：**荧光反应液（白光 tunel 反应液）**和 **TdT 酶**按 50:1 比例混合，此液为 **tunel 工作液**，将 **tunel 工作液**加入到圈内覆盖组织，切片平放于湿盒内，37℃恒温箱孵育 30min 到 2 小时（**具体需要预实验**），湿盒内加少量水保持湿度。
- 4、**若为白光 tunel**，按以下操作：hrp 二抗孵育以及 DAB 显色：玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min，然后 **hrp 二抗工作液**室温孵育 25min（**hrp 二抗工作液，Streptavidin-HRP：PBST=1:1000**），；玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min；**DAB 反应液（客户自备）**显色；酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。
- 5、**若为荧光 tunel**，按以下操作：DAPI 复染细胞核：切片用 PBS（PH7.4）洗涤 3 次，每次 5min。去除 PBS 后在圈内滴加 DAPI 染液，避光室温孵育 10min。
- 6、**封片**：玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。
- 7、**镜检拍照**：切片于尼康倒置荧光显微镜下观察并采集图像。（紫外激发波长 330-380nm，发射波长 420nm；FITC 绿光激发波长 465-495nm，发射波长 515-555 nm；CY3 红光激发波长 510-560，发射波长 590nm）

三、石蜡切片荧光 tunel/白光 tunel 结果判读

DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色，试剂盒为 Alexa488/cy3 标记，阳性凋亡细胞核为绿色/红色；白光 tunel 阳性表达为黄色至棕黑色，正常细胞为蓝色。