

冰冻切片荧光 TUNEL 染色实验报告

一、实验器材及试剂

1. 实验器材

名称	厂家	型号
冰切机	赛默飞	NX50
OCT 包埋剂	樱花	4583
刀片	上海徕卡仪器有限公司	LEICA819
载玻片	陕西依科生物技术服务有限公司	YK116
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432c
脱色摇床	北京市六一仪器厂	WD-9405A
涡旋混合器	天悦电子	TYXH-II
移液枪	Dragon	KE0003087/KA0056573
组化笔	福州迈新	PEN-0002
正置显微镜	日本尼康	ci-s
扫描仪（白光、荧光）	3DHISTEC	PannoramicMIDI

2. 主要实验试剂

试剂	厂家
Proteinase k 工作液	陕西依科生物技术服务有限公司
PBS 缓冲液	陕西依科生物技术服务有限公司
BSA	BioFROXX
TUNEL 试剂盒	罗氏 11684817910
中性树胶	陕西依科生物技术服务有限公司
抗荧光淬灭剂	博士德
固定液	陕西依科生物技术服务有限公司
DAPI	MCE

二、TUNEL 染色实验原理及步骤

实验原理 TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 细胞凋亡检测试剂盒是用来检测组织细胞在凋亡早期过程中细胞核 DNA 的断裂情况。其原理是荧光素 (fluorescein) 标记的 dUTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT Enzyme) 的作用下, 可以连接到凋亡细胞中断裂 DNA 的 3' -OH 末端, 并与连接辣根过氧化物酶 (HRP, horse-radish peroxidase) 的荧光素抗体特异性结合, 后者又与 HRP 底物二氨基联苯胺 (DAB) 反应产生很强的颜色反应 (呈深棕色), 特异准确地定位正在凋亡的细胞, 因而在光学显微镜下即可观察凋亡细胞; 由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 断裂, 因而没有 3' -OH 形成, 很少能够被染色。本

试剂盒适用于组织样本（石蜡包埋、冰冻和超薄切片）和细胞样本（细胞涂片）在单细胞水平上的凋亡原位检测。还可应用于抗肿瘤药的药效评价，以及通过双色法确定细胞死亡类型和分化阶段。

冰冻切片荧光 TUNEL 染色实验步骤

1. **复温，水洗：**将切片从-20℃拿出来复温 30min，蒸馏水洗两次，每次 8min；
2. **固定：**将切片至于4%的多聚甲醛中固定15min，用PBS洗3次，每次5min；
3. **封闭：**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加5%BSA，室温封闭1h；
4. **制备 TUNEL 反应液：**制备 TUNEL 反应混合液，处理组用 50 μ l TdT+450 μ l 荧光素标记的 dUTP 液混匀；而阴性对照组仅加 50 μ l 荧光素标记的 dUTP 液，阳性对照组先加入 100 μ l DNase 1，后面步骤同处理组。
5. **滴加 TUNEL 反应液：**玻片干后，加 50 μ l TUNEL 反应混合液（阴性对照组仅加 50 μ l 荧光素标记的 dUTP 液）于标本上，加盖玻片或封口膜在暗湿盒中反应 37℃ $\times$ 1h。
6. **漂洗：**PBS 漂洗 3 次，每次 8min；
7. **镜下观察：**可以加 1 滴 PBS 在荧光显微镜下计数凋亡细胞（激发光波长为 450~500nm，检测波长为 515~565nm）；DAPI 复染核，PBS 漂洗 3 次，每次 8min；抗荧光淬灭剂封片。
8. **拍照时可结合凋亡细胞形态特征来综合判断**（未染色细胞变小，胞膜完整但出现发泡现象，晚期出现凋亡小体，贴壁细胞出现皱缩、变圆、脱落；而染色细胞呈现染色质浓缩、边缘化，核膜裂解，染色质分割成块状/凋亡小体）

三、染色结果判读：DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色，阳性表达为绿色。



陕西依科生物技术服务有限公司
