组织、细胞荧光 TUNEL 染色实验报告(罗氏）

一、实验器材及试剂

1. 实验器材

名称	厂家	型号
脱水机	俊杰电子有限公司	JJ-12J
包埋机	俊杰电子有限公司	JB-P5
病理切片机	上海徕卡仪器有限公司	RM2016
刀片	上海徕卡仪器有限公司	LEICA819
冻台	俊杰电子有限公司	JB-L5
组织摊片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司	KD-P
烤箱	上海慧泰仪器制造有限公司	DHG-9140A
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）	日本滨松	NanoZoomer-SQ
扫描仪（白光、荧光）	3DHISTEC	PannoramicMIDI

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	10009218
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023428
Proteinase k 工作液	麦克林	P6157
PBS 缓冲液	陕西依科生物技术服务有限公司	BF002
TritonX-100	Vetec	V900502
BSA	BioFROXX	EZ2811C238
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	YK1557
抗荧光淬灭剂	陕西依科生物技术服务有限公司	YK2256

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。

石蜡切片 TUNEL 染色实验步骤

1. **石蜡切片脱蜡至水：**依次将切片放入二甲苯Ⅰ8min-二甲苯Ⅱ8min-无水乙醇Ⅰ 6min-无水乙醇Ⅱ6min-95%酒精6min-85%酒精6min-75%酒精5min-流水冲洗；
2. **通透：**用 20ug/ml 的 Proteinase K 工作液处理组织 15min 或者细胞爬片加细胞通透液 0.3% TritonX-100 15min；
3. **漂洗：**PBS 漂洗 2 次；每次 8min；
4. **灭活：**0.3%甲醇过氧化氢灭活 15min；PBS 漂洗 2 次；每次 8min；
5. **封闭：**5%BSA 室温封闭 1h；
6. **制备 TUNEL 反应液：**制备 TUNEL 反应混合液，处理组用 50μl TdT+450μl 荧光素标记的 dUTP 液混匀；而阴性对照组仅加 50μl 荧光素标记的 dUTP 液，阳性对照组先加入 100μl DNase 1，后面步骤同处理组。
7. **滴加 TUNEL 反应液：**玻片干后，加 50μl TUNEL 反应混合液（阴性对照组仅加 50μl 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℃×1h。
8. **漂洗：**PBS 漂洗 3 次，每次 8min；
9. **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。
10. 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）

对于培养细胞的预处理：

①在载玻片上铺一层薄薄的多聚赖氨酸，干燥后在去离子水中漂洗，干燥后 4℃保存；
②适当方法诱导细胞凋亡，同时设未经诱导的对照组，各组离心收集约 1×106 个细胞，PBS 洗一次，重悬，加到铺好的多聚赖氨酸载玻片上，自然干燥，使细胞很好的吸附到载玻片上；
③将吸附细胞的载玻片在 4%多聚甲醛中固定 25min；
④PBS 浸洗二次，每次 5min；
⑤将吸附细胞的载玻片在 0.3%的 Triton X-100 中处理 5min；
⑥PBS 浸洗二次，每次 5min；
后续操作如同石蜡包埋切片的 6-15。

三、染色结果判读：荧光 tunel：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。