

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司

Tunel-DAB (石蜡切片)

一、实验器材及试剂

主要试剂

1. 罗氏 Tunel 试剂盒 (货号: 11684817910)
- 注意: 做 TUNEL 当天早晨放到 4℃ 冰箱复温解冻
2. 蒸馏水 (PH7.25~7.35)
3. TBS (湖北百奥斯生物科技有限公司)
4. 康莱透明脱蜡剂
5. 酒精 (国药集团 10009218) 三个梯度 100%、95%、75%
6. Tu 破膜液 (0.1%TritonX-100,0.1%柠檬酸钠)
7. DAB 显色剂 (DAKO code:k5007)
8. 盐酸酒精 (湖北百奥斯生物科技有限公司)
9. 正常山羊血清 (博士德 AR1009)
10. 30%H₂O₂ (国药集团 10011218)
11. 苏木素 (BaSo BA-4041)

实验器材

湿盒、移液枪、离心管、修复盒、组画笔、封片剂 (盖宝)

二、实验步骤

1. 石蜡切片脱蜡至水, 环保透明剂 (三缸 10min, 10min, 10min), 梯度酒精 (无水、95%、75%) 每缸 5min, 自来水冲洗干净后, 用蒸馏水冲洗一次, 然后用组化笔画圈并浸泡于 TBS 中。
2. Tu 破膜液 (0.1%TritonX-100, 0.1%柠檬酸钠) 室温滴加, 通透 8min。
3. TBS 洗 3 次, 每次 5min。
4. 每张切片滴加 10% 山羊血清封闭非特异性反应, 室温 30min, 不洗。
5. 甩去血清, 每张切片滴加 Tunel 反应混合液, 每张 50ul 临用前配制 (A 液: B 液=1:20) 混匀, 避光湿盒中 37℃ 孵育 60min, 阴性对照用 TBS 代替工作液。(这一步骤注意避光)
6. 完成后 TBS 洗 3 次, 每次 5min。
7. 3%H₂O₂ (用蒸馏水稀释) 阻断, 室温避光 10min, 完成后 TBS 洗 3 次, 每次 5min
8. 再次封闭, 20% 山羊血清 37℃ 封闭 20min, 不洗。
9. 甩去血清, 每张切片滴加 POD 溶液, 放在避光盒中 37℃ 孵育 30min。完成后 TBS 洗 3 次, 每次 5min。
10. 每张切片滴加新鲜配制的 DAB 溶液, 镜下控制显色, 并记录显色时间。
11. 终止显色, 自来水冲洗, 苏木素复染 1 分钟 (时间由苏木素新旧, 环境温度以及组织而定) 自来水冲洗, 盐酸酒精分化 1~2 秒, 自来水冲洗, 返蓝液返蓝。
12. 切片放置梯度酒精脱水干燥, 环保型无毒封片剂封片镜检。