

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司

荧光 TUNEL (石蜡切片)

(一) 试剂:

1. TUNEL BrightGreen Apoptosis Detection Kit (诺唯赞 TUNEL 试剂盒, 货号: A112)

TUNEL BrightRed Apoptosis Detection Kit (诺唯赞 TUNEL 试剂盒, 货号: A113)

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. DAPI (Solarbio C0060)

7. 抗荧光衰减封片剂 (Southern Biotech 0100-01)

8. Tu 破膜液 (0.1% TritonX-100, 0.1% 柠檬酸钠)

仪器: 湿盒、移液枪、离心管、修复盒、组化笔

(二) 操作步骤:

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. 在修复盒中加入抗原修复液 (PH6.0) 的柠檬酸修复, 修复液应没过切片。将修复盒放入微波炉中, 中火修复 3min30s, 待修复液自然冷却至室温 (25-30℃) (约 1hr) 后, 将切片从修复液中取出, 置于蒸馏水中浸洗 3 分钟。

3. TBS 洗 3 次, 每次 5min。

4. 依照表 1, 准备足够量的用于所有实验的和可选阳性对照反应的 TdT 孵育缓冲液。(这一步骤开始注意避光。) 一个标准反应其体积是 50μl, 用 50μl 乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需 TdT 孵育缓冲液的总体积。对于表面积更大的样本, 可成比例的增大试剂体积。

表 1: 准备用于实验的和可选阳性对照反应的 TdT 孵育缓冲液

组分	体积 (μl/50μl 体系)
ddH ₂ O	34
5×Equilibration Buffer	10
FITC-12-dUTP Labling Mix	5
Recombinant TdT Enzyme	1

5. 阴性对照体系: 准备一份不含 TdT 酶的对照孵育缓冲液, 用 ddH₂O 替代 TdT 酶。

6. 甩去切片上 1×Equilibration Buffer 中的大部分, 然后在组织上加入 50μl TdT 孵育缓冲液。不要让组织干片。这之后的操作, 载玻片要避光。

7. 将载玻片置于湿盒内 4℃ 过夜。将湿盒用铝箔纸包裹以避光。

8. 将湿盒从冰箱取出, 分散依次摊开进行复温, 计时 15--20min 后用 TBS 冲洗, 后将切片置于铁架上, 用蒸馏水冲洗切片 2-3 次后, 将切片置于加过吐温的 TBS 中浸泡冲洗 3 次/5min。

9. DAPI 染核, 避光室温 5min。

10. 完成后 TBS 洗 3 次, 每次 5min。

湖北百奥斯（Biossci）生物科技有限公司

11.抗荧光衰减封片剂封片，避光 4℃保存，待检拍照。

（三）注意事项

- 1.tunel 反应试剂每次需要现配现用，不能提前配制。
- 2.每次都需要加好阳性对照组织，保证实验结果的稳定性。
- 3.开启新的 tunel 试剂盒一定先做好验证。保证试剂盒的正常使用。并标记好开启日期。