

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司

荧光 TUNEL (细胞爬片)

(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. DAPI (Solarbio C0060)

5. 封片剂 (Southern Biotech 0100-01)

6. 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. 细胞室温复温 15 分钟, 然后用组化笔沿着爬片边缘画圈, TBS 洗涤三次, 每次 5 分钟。(如果细胞未固定, 先用 4% 多聚甲醛室温进行固定 15 分钟, 然后再画圈, TBS 洗涤)。

2. 把柠檬酸修复液加入到细胞孔板里放入到 60℃ 恒温箱 1h。

3. Tu 破膜液 (0.1% TritonX-100, 0.1% 柠檬酸钠) 室温滴加, 通透 5min。

4. 按 1:100 的比例, 将 2mg/ml 的 Proteinase K 溶液用 1×TBS 稀释, 使其终浓度为 20 μg/ml。每个样本上滴加 50 μl 稀释好的 Proteinase K 溶液, 使溶液覆盖全样本区域, 室温孵育 5min。

5. TBS 洗 3 次, 每次 5min。

6. 按 1:5 的比例用去离子水稀释 5×Equilibration Buffer。

7. 每个样本滴加 50 μl 1×Equilibration Buffer 使其全部覆盖待检样本区域, 室温孵育 30 分钟。或者将载玻片放入一个含有 1×Equilibration Buffer 的缸中, 保证缓冲液没过样本。

8. 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 50 μl, 用 50 μl 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

9. 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。

甩去切片上 1×Equilibration Buffer 中的大部分, 然后在组织上加入 50 μl 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。

10. 将载玻片置于湿盒内 4℃ 过夜。将湿盒用铝箔纸包裹以避光。

湖北百奥斯（Biossci）生物科技有限公司

- 11.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。
- 12.DAPI 染核，避光室温 5min。
- 13.完成后 TBS 洗 3 次，每次 5min。
- 14.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。
- 4.细胞爬片要先固定再开展后续实验。
- 5.开始前要提前观察细胞的形态及密度，如果有异常要终止后续实验。
- 6.细胞爬片不能长久放置，所以要优先安排实验。