

# Tunel 实验报告

## 一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
青链霉素	合肥知恩生物	ZNCA-008
胰蛋白酶	合肥知恩生物	ZNCA-009
DAPI	碧云天	C1002
抗荧光淬灭封片剂	赛维尔	G1401
胎牛血清	合肥知恩生物	ZNCA-007
Tunel 试剂盒	赛维尔	G1501
乙醇	沪试	10009257
PBS	赛维尔	G4202-500ML

## 二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
超净工作台	苏州安泰	SW-CJ-2FD
显微镜	江南永新	XD202
CO2 培养箱	Thermo	3111
荧光显微镜	广州明美	MF52

## 三、实验方法

### 1. TUNEL 法检测原位组织细胞凋亡情况

- 石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯I 10min-二甲苯II 10min-二甲苯III 10min-无水乙醇I 5min-无水乙醇II 5min-无水乙醇 III 5min -蒸馏水洗。(冬天应该适当延长脱蜡时间)
- 蛋白酶 K 修复：切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止液体流走），在圈内滴加蛋白酶 K 工作液覆盖组织，37 度温箱孵育 22min。将玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。(蛋白酶 K 工作液配置方法，原液：PBS=1:9)
- 破膜：切片稍甩干后在圈内滴加破膜工作液覆盖组织，常温下孵育 20min，将玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。(破膜液为 0.1%triton. 配置方法，triton 原液：PBS=1:1000)
- 室温平衡：切片稍甩干后在圈内滴加 buffer 覆盖组织，buffer 常温孵育 10min。
- 加反应液：按片子数量和组织大小取 tunel 试剂盒内适量 TDT 酶，dUTP,buffer 按 1:5:50 比例混合，加到圈内覆盖组织，切片平放于湿盒内，37°C 恒温箱孵育 2 小时，湿盒内加少量水保持湿度。
- DAPI 复染细胞核：切片用 PBS（PH7.4）洗涤 3 次，每次 5min。去除 PBS 后在圈内滴加 DAPI 染液，避光室温孵育 10min。
- 封片：玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干，用抗荧光淬灭封片剂封片。
- 镜检拍照：切片于荧光显微镜下观察并采集图像。(DAPI 紫外激发波长 330-380nm，发

射波长 420nm, 发蓝光; FITC 激发波长 465-495nm, 发射波长 515-555 nm, 发绿光。

## 2. TUNEL 法检测细胞凋亡情况

- (1) 细胞破膜: 爬片稍甩干后用组化笔在盖玻片中间细胞分布均匀的位置画圈(防止抗体流走), 每个样本浸于破膜液中, 室温孵育 5 min 进行通透处理(注意: 推荐用 2-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Proteinase K 工作液先消化, 37°C 处理 10 min 左右, 视细胞状态调整。若细胞易掉片则建议选择用破膜液处理), PBS 洗 3 次, 每次 5 min。
- (2) 室温平衡: 爬片稍甩干后在圈内滴加 buffer 覆盖组织, buffer 常温孵育 10min。
- (3) 加反应液: 按爬片数量大小取 tunel 试剂盒内适量 TDT 酶, dUTP, buffer 按 1:5:50 比例混合, 加到圈内覆盖细胞, 爬片置于 37°C 恒温箱孵育 1 小时。
- (4) DAPI 复染细胞核: 爬片用 PBS (PH7.4) 洗涤 3 次, 每次 5min。去除 PBS 后在圈内滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10min。
- (5) 封片: 爬片用 PBS (PH7.4) 洗涤 3 次, 每次 5min。爬片稍甩干后将有细胞的一面朝下用抗荧光淬灭封片剂将玻片封固在载玻片上封片。
- (6) 镜检拍照: 切片于荧光显微镜下观察并采集图像。(DAPI 紫外激发波长 330-380nm, 发射波长 420nm, 发蓝光; FITC 激发波长 465-495nm, 发射波长 515-555 nm, 发绿光; CY3 激发波长 510-560, 发射波长 590nm, 发红光)。