

Tunel 试剂盒

原理： 细胞在发生凋亡时，会激活一些 DNA 内切酶，这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA。DNA 会被降解为 180-200 bp 的片段，并暴露出大量的 3'-OH 末端，在 TdT 酶的作用下，在基因组 DNA 断裂时暴露出的 3'-OH 末端掺入生物素标记的 dUTP (Biotin-dUTP)，随后用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的链霉亲和素 (Streptavidin-HRP, HRP 二抗)，检测被生物素 (Biotin) 标记的 DNA 末端，最后通过加入 HRP 的底物混合液 (DAB) 进行显色反应，使得凋亡细胞的细胞核被染成棕黄色，从而可以用普通光学显微镜检测。

产品货号：RCT-50D；

规格：100T

有效期：12 个月

试剂盒组成：

试剂名称	规格	保存条件
TdT 酶	100 μ l	-20 $^{\circ}$ C
Tunel 反应液	5ml	-20 $^{\circ}$ C
HRP 二抗	25 μ l	-20 $^{\circ}$ C

操作流程：

1、 切片预处理

(1) 石蜡切片

- 切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯 I 15min-二甲苯 II 15min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min-85% 酒精 5min-75%酒精 5min-蒸馏水洗。(冬天应提高脱蜡温度或适当延长脱蜡时间)
- 石蜡通透方式有多种：热修复 (EDTA 或者柠檬酸修复液 95 度水浴 25min)、蛋白酶消化 (20 μ g/ml 蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 处理 15-30min)、Triton X-100 通透剂通透等。玻片置于蒸馏水中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

(2) 冰冻切片

- 固定：冰冻切片固定 10-30min，PBS 洗 5min，重复 3 次。
- 通透：20 μ g/ml 蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 处理 15-30min，玻片置于蒸馏水中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
- (选做) 滴加 0.3% triton-X100 破膜液通透 20min，蒸馏水洗 5min，重复 3 次。

(3) 细胞爬片或者细胞涂片

- 固定：冰冻切片固定 10-30min，弃固定液，PBS 洗 5min，重复 3 次。
- 通透：20 μ g/ml 蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 处理 15-30min，玻片置于蒸馏水中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
- (选做) 滴加 0.3% triton-X100 破膜液通透 20min，蒸馏水洗 5min，重复 3 次。

2、 双氧水封闭：切片滴加适量 3% H₂O₂ 室温封闭 25min，玻片置于纯水中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

3、 配试剂工作液以及孵育：TdT 酶 和 tunel 反应液按 1:50 比例混合，此液为 tunel 工作液，将 tunel 工作液加入到圈内覆盖组织，切片平放于湿盒内，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光孵育 30min 到 2 小时 (具体需要预实验)，

湿盒内加少量水保持湿度。

- 4、**HRP 二抗孵育**：玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min，然后 hrp 二抗工作液室温孵育 25min (hrp 二抗工作液，Streptavidin-HRP 二抗：PBST=1:1000)，玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
- 5、**DAB 显色**：切片滴加适量新鲜配置的 DAB 显色液显色数秒，纯水冲洗终止显色（显色较快，注意把控显色程度）。
- 6、**复染细胞核**：Harris 苏木素复染 3min 左右，自来水洗，1%的盐酸酒精分化数秒，自来水冲洗，氨水返蓝，流水冲洗。
- 7、**脱水透明封片**：将切片依次放入 75%酒精 6min-85%酒精 6min -无水乙醇 I 6min -无水乙醇 II 6min -二甲苯 I 5min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树胶封片。

Tunel 结果判读

Tunel 阳性表达细胞核为黄色至棕黄色，正常细胞为蓝色。

备注

1. 为了获得理想的染色效果，应对通透方式、时间及 tunel 工作液孵育时间进行摸索
2. 所有实验试剂应避免反复冻融，建议分装保存。
3. 蛋白酶 K 处理后需充分洗涤去掉多余试剂。
4. Tunel 显色为避免假阳性，应严格控制显色过程，可短时间多次显色，镜下观察显色程度，切忌显色过度。
5. 建议设置对照实验，阴性对照（不加 TdT 酶）、阳性对照（DNase I 预处理）验证实验有效性。

文章引用试剂盒/方法：TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick

End Labeling) staining was performed with a TUNEL kit(Shanghai Huilanbio Biological Technology, Shanghai, China) which was based on the principle of TUNEL detects the apoptosis according to the instruction manual.