

Tunel 试剂盒 (cy3)

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。细胞凋亡时抽提 DNA 进行电泳检测，可以发现 180-200bp 的 DNA ladder。基因组 DNA 断裂时，暴露的 3'-OH 可以在末端脱氧核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT)的催化下加上绿色 FITC 或 Alexa488/红色荧光探针 Cy3(Cyanine 3)标记的 dUTP，从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测，这就是 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)法检测细胞凋亡的原理。

产品货号：RCT-50R ；

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℃
Tunel 反应液 (cy3 标记)	5ml	-20℃

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℃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℃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℃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。

- 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℃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。

- 3、**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。
- 4、**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。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。
- 5、**镜检拍照：**切片于荧光显微镜下观察并采集图像。（紫外激发波长 330-380nm，发射波长 420nm；488 绿光激发波长 465-495nm，发射波长 515-555 nm；CY3 红光激发波长 510-560，发射波长 590nm）。

Tunel 结果判读

DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色，试剂盒为 cy3 标记，阳性凋亡细胞核为红色。

备注

1. 为了获得理想的染色效果，应对通透方法时间及 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

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.