

## Tunel 试剂盒 (488)

**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-50G ;

**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 μl	-20°C
Tunel 反应液 (488 标记)	5ml	-20°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 μg/ml 蛋白酶K 37°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 μg/ml 蛋白酶K 37°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 μg/ml 蛋白酶K 37°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、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°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。

**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 488 标记，阳性凋亡细胞核为绿色。

### 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.