

细胞爬片组化 DABtunel 实验报告

一、实验原理

当细胞凋亡时，染色体 DNA 双链断裂而产生大量的粘性 3'-OH 末端，可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT）的作用下，将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3'-末端，从而可进行凋亡细胞的检测（TUNEL 法）。

二、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
脱色摇床	武汉赛维尔生物科技有限公司	SYC-Z100
涡旋仪	武汉赛维尔生物科技有限公司	MX-F
掌上离心机	武汉赛维尔生物科技有限公司	DS-S 100
组化笔	Gene tech	GT1001
移液枪	Dragon	KE003068
盖玻片	江苏汇达医疗器械有限公司	710510
显微镜	NIKON	ECLIPSE C1
3D 扫描仪	3D HISTECH	Pannoramic SCAN

2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号
无水乙醇	杭州宏达化工仪器有限公司	SJ003614



二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023418
PBS 缓冲液	杭州浩克生物技术有限公司	HK0002
通透破膜剂	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0008
DABtunel 试剂盒	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0012
苏木素染液	杭州浩克生物技术有限公司	HK2053
盐酸分化液	国药集团化学试剂有限公司	HK2054
氨水水溶液返蓝液	MACKLIN	HK2055
中性树脂	国药集团化学试剂有限公司	10004160

三、实验步骤

- 1. 细胞通透修复:** 细胞爬片中加入 pbs 在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min, 后再爬片内加入足量的细胞通透破膜液室温孵育 10min。孵育完后用纯水在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。
- 2. 画组化圈:** 在爬片的玻片最外圈用组化笔画一个组化圈, 防止后加入的试剂流出。
- 3. 加试剂:** 按片子数量和组织大小取 tunel 试剂盒内适量试剂 TdT 酶 和白光反应液, 按 1:100 混合, 加到圈内覆盖组织, 切片平放于湿盒内, 37°C 恒温孵育 1 小时, 湿盒内加少量水保持湿度。
- 4. HRP 二抗孵育:** 切片用 PBS (PH7.4) 洗涤 3 次, 每次 5min。然后加 HRP 二抗工作液室温孵育 30min, 工作液浓度 HRP: PBST=1:500, 洗涤后 DAB 显色。
- 5. 复染细胞核:** 苏木素染色 2-3min 左右, 自来水洗, 分化液分化 2 秒, 自来水冲洗, 返蓝液返蓝 15-30s, 流水冲洗。
- 6. 脱水封片:** 在爬片内依次放入 75%酒精 4 min—85%酒精 4 min—无水乙醇I 4 min—无水乙醇II 4 min 中脱水, 将玻片片从爬片中取出来稍晾干, 中性树脂封片。



四、结果判读

苏木素染出来的细胞核为蓝色，试剂盒标记棕色为阳性凋亡细胞核。

五、注意事项

1. 实验过程中爬片勿干片；
2. 添加 tunel 反应液之前需要换纯水洗涤。