

湖北百奥斯（Biossco）生物科技有限公司

荧光 Tunel (冰冻切片)

（一）试剂：

1.TUNEL BrightGreen Apoptosis Detection Kit (诺唯赞 Tunel 试剂盒，货号：A112)

TUNEL BrightRed Apoptosis Detection Kit (诺唯赞 Tunel 试剂盒，货号：A113)

注意：做 TUNEL 当天早晨放到 4℃冰箱复温解冻

2. 蒸馏水 (PH7.25~7.35)

3. TBS (湖北百奥斯生物科技有限公司)

4. DAPI (Solarbio C0060)

5. 封片剂 (Southern Biotech 0100-01)

6. Tu 破膜液 (0.1%TritonX-100,0.1%柠檬酸钠)

仪器：湿盒、移液枪、离心管、修复盒、组化笔

（二）步骤：

1.冰冻切片室温复温 15 分钟，然后用组化笔画圈，TBS 洗涤三次，每次 5 分钟。(如果组织未固定，先用 4%多聚甲醛进行固定 15 分钟，然后再画圈，TBS 洗涤)

2.Tu 破膜液 (0.1%TritonX-100,0.1%柠檬酸钠) 室温滴加，通透 8min。

3.TBS 洗 3 次，每次 5min。

4.按 1:100 的比例，将 2mg/ml 的 Proteinase K 溶液用 1×TBS 稀释，使其终浓度为 20 μg/ml。每个样本上滴加 50 μl 稀释好的 Proteinase K 溶液，使溶液覆盖全样本区域，室温孵育 5min。

5.TBS 洗 3 次，每次 5min。

6.按 1:5 的比例用去离子水稀释 5×Equilibration Buffer。

7.每个样本滴加 50μl 1×Equilibration Buffer 使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 30 分钟。或者将载玻片放入一个含有 1×Equilibration Buffer 的缸中，保证缓冲液没过样本。

8.依照表 1，准备足够量的用于所有实验的和可选阳性对照反应的 TdT 孵育缓冲液。(这一步骤开始注意避光。)一个标准反应其体积是 50μl，用 50μl 乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需 TdT 孵育缓冲液的总体积。对于表面积更大的样本，可成比例的增大试剂体积。

表 1：准备用于实验的和可选阳性对照反应的 TdT 孵育缓冲液

组分	体积 (μl/50μl 体系)
ddH2O	34
5×Equilibration Buffer	10
FITC-12-dUTP Labeling Mix	5
Recombinant TdT Enzyme	1

9.阴性对照体系：准备一份不含 TdT 酶的对照孵育缓冲液，用 ddH2O 替代 TdT 酶。

10.甩去切片上 1×Equilibration Buffer 中的大部分，然后在组织上加入 50μl TdT 孵育缓冲液。不要让组织干片。这之后的操作，载玻片要避光。

11.将载玻片置于湿盒内，在 37℃孵育 60min。将湿盒用铝箔纸包裹以避光。

12.孵育完成后，TBS 洗 3 次，每次 5min。

13.DAPI 染核，避光室温 10min。

湖北百奥斯（Biossci）生物科技有限公司

-
- 14.完成后 TBS 洗 3 次，每次 5min。
 - 15.抗荧光衰减封片剂封片，避光 4℃保存，待检拍照。

（三）注意事项

- 1.tunel 反应试剂每次需要现配现用，不能提前配制。
- 2.每次都需要加好阳性对照组织，保证实验结果的稳定性。
- 3.开启新的 tunel 试剂盒一定先做好验证。保证试剂盒的正常使用。并标记好开启日期。