

细胞凋亡染色（TUNEL）实验报告

一、实验材料

1. 主要试剂

切片石蜡（北京索莱宝科技有限公司，YA0011）
二甲苯（国药集团化学试剂有限公司，10023418）
无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司，10009218）
TUNEL 染色试剂盒（上海碧云天生物，C1091）
苏木素染色剂（北京索莱宝科技有限公司，G1140）
中性树胶（北京索莱宝科技有限公司，G8590）

2. 主要仪器设备

超纯水仪（美国密理博公司，Milli-Q synthesis）
组织脱水机（上海徕卡仪器有限公司，ASP300）
全自动包埋机（上海徕卡仪器有限公司，EG1140H）
石蜡切片机（上海徕卡仪器有限公司，RM2235）
摊片机（上海徕卡仪器有限公司，HI1210）
烤片机（上海徕卡仪器有限公司，HI1220）
烘箱（上海福玛实验设备有限公司，DGX-9003B）
光学显微镜（日本奥林巴斯，BX51）

二、实验方法

1. 染色原理

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）的催化下加上荧光素（FITC）或者辣根过氧化物酶（HRP）标记的 dUTP（fluorescein-dUTP），从而可以通过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。

2. 染色步骤

(1) 切片脱蜡：二甲苯 I 脱蜡 5~10 min→二甲苯 II 脱蜡 5~10 min→无水乙醇 5 min→90%乙醇 2 min→70%乙醇 2 min→蒸馏水 2 min。

(2) 通透：组织切片上滴加 100 μl Proteinase K 工作液，37°C反应 30 min。

(3) 封闭：样本片浸入封闭液中，室温（15~25°C）封闭 10 min；样本片浸入 1×PBS 漂 3 次，每次 5 min。

(4) 制阳性片：配制 100 μl 含不同活性单位 U 的 DNase I 反应液，在一张样本上滴加 100 μl 上述配制好的 DNase I 反应液，室温下处理 10~30 min，上述阳性片浸入 1×PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

(5) 连接：配制 TdT 酶反应液，每个样本上滴加 50 μl TdT 酶反应液，加盖玻片放入温盒中，37°C避光反应 60 min，反应后的样本片浸入 1×PBS 漂洗 3 次，每次 5 min；

(6) 标记：每个样本上滴加 50 μl Streptavidin-HRP 工作液，加盖玻片放入温盒中，37°C避光反应 30 min；

(7) 显色：样本周围用吸水纸吸干，每个样本上滴加 50 μl DAB 工作液，室温显色反应 30 s~5 min；显色后的样本片浸入 1×PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。

(8) 复染：苏木素染色 30 s~5 min（请在显微镜下观察确定），水洗 3 次

(9) 脱水封片：梯度酒精脱水透明，二甲苯透明，中性树胶封片

(10) 镜下拍照：观察各组大鼠脊髓组织凋亡情况，每张切片随机选取 5 个视野，光学显微镜下计数每个视野中阳性细胞占总细胞（按 100 个细胞计算）的

比例，取平均值。凋亡率=阳性细胞数/总细胞数×100%。

3. 数据处理及统计学方法

实验所得数据采用平均数±标准误（Mean±SEM）表示，所有的数据均使用 GraphPad Prism 6 处理及统计分析。两组样本均值之间的比较采用 *t* 检验，多组样本均值之间的比较采用 ANOVA 检验，*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。



三、实验结果

根据 TUNEL 染色结果（图 1）可以观察到，TUNEL 染色阳性细胞的细胞核被染为棕褐色，且形态、大小各异，另有少量细胞核被淡染为棕黄色，其以散在的形式不均匀地分布于正常细胞之间。Group-1 偶见阳性细胞，Group-2 阳性细胞显著增多，并且高于 Group-3 和 Group-4。

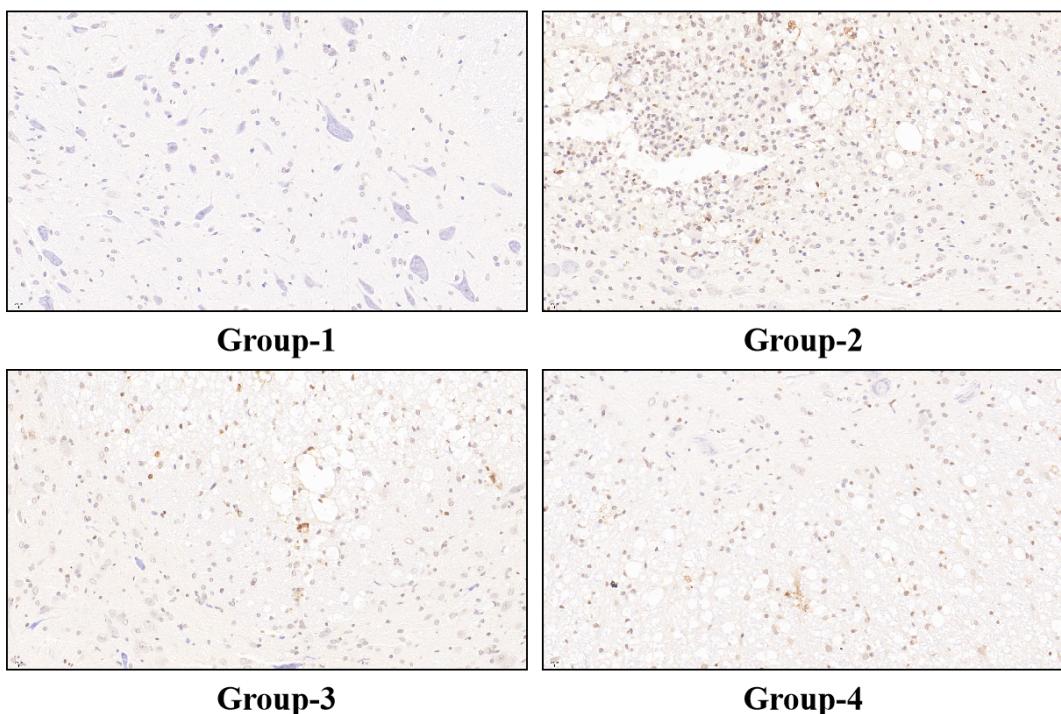


图 1 各组组织 TUNEL 染色结果比较 ($200\times$, $n=3$)



TUNEL 阳性细胞率统计结果（图 2）显示，与 Group-1 相比，Group-2、Group-3、Group-4 的 TUNEL 阳性细胞率显著升高；与 Group-2 相比，Group-3、Group-4 的 TUNEL 阳性细胞率显著降低。

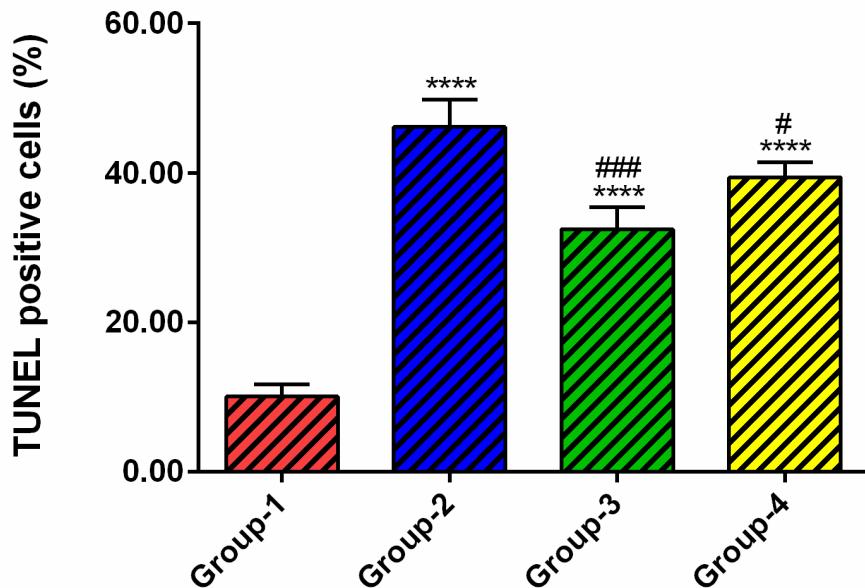


图 2 各组组织 TUNEL 阳性细胞率结果比较

(**** $P<0.0001$ vs. Group-1; # $P<0.05$, ### $P<0.001$ vs. Group-2, $n=3$)