ttt

**Tunel-FITC/CY3+IF实验**

**检测结题报告**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **客户姓名** |  | **订单编号** |  |
| **项目启动日期** |  | **项目完成日期** |  |
| **报告撰写人** |  | **报告复核人** |  |
| **报告授权人** |  | **报告生效日期** |  |

尊敬的客户：

您好！

**成都奥创生物科技有限公司**是联合多家高校、科研院所发起，由一批基础生物学、生物医药、临床医学领域杰出的科学家带队组成。主营业务包括整体课题项目服务实验（分子、蛋白、细胞、动物、病理等），全方位生物、医学研究技术服务和科研设计咨询、生物医药企业CRO外包服务等。

**成都奥创生物**联合多位来自于了中山大学、四川农业大学、华中农业大学、四川大学、中科院等著名高校以及研究机构的专家学者担任企业顾问，其中专业覆盖肿瘤学、蛋白免疫学、分子生物学、细胞生物学、形态学等诸多领域，并与国内相关领域的专家以项目合作的方式联合开展转化医学研究，组成了一个优势交叉互补、高度专业的科研团队，负责研发课题的具体实施和推进，确保各项目的高效与质量。致力于实验科研平台互联，资源共享。借助此平台为广大科研院校，生物医药企业及个人提供分子、蛋白、细胞、病理等研究技术服务。

1. **整体项目平台**

能为广大客户提供从课题咨询，课题设计，项目实施到论文撰写，润色，发表等一站 式整体课题外包服务，强大的科研团队，全面的技术平台和完善的管理体系，让您的课题进展更加高效。

1. **核酸研究平台**

服务项目：核酸抽提，常规PCR，荧光定量PCR，微滴式数字PCR，载体构建，甲基化检测等。

1. **蛋白与免疫平台**

服务项目：Western blot，IP/COIP检测，无标记分子互作检测，ELISA，多因子蛋白悬液芯片检测，蛋白表达纯化，蛋白质谱等。

1. **细胞研究平台**

服务项目：细胞周期，细胞凋亡，细胞增殖，细胞共培养及趋化，细胞迁移及侵袭，细胞粘附检测，流式细胞检测，稳转细胞系构建，细胞单克隆形成检测，双荧光素酶检测，显微拍照检测等。

1. **病毒包装平台**

服务项目：慢病毒包装，逆转录病毒包装，腺病毒包装，腺相关病毒包装等。

1. **病理染色**

服务项目：各类切片及染色服务，电镜检测，免疫荧光，免疫组化，tunel，原位杂交染色，全景扫描，分析阅片等。

1. **动物模型平台：**

服务项目：常见疾病动物模型及肿瘤模型构建，肝功，肾功，血糖，血脂，无机离子，尿常规，凝血检测，血常规等生化检测。

**我们的服务承诺：** █ 唯一 █ 真实 █ 专业 █ 效率

欢迎科研院所、医院、生物医药企业的广大用户来我公司进行科研项目订制，我们将为您提供专业高效的一站式科研服务。

## 声明

为保证独立、客观、公正地从事检验检测工作，提高服务质量。现以奥创生物名义，向社会各界和客户作如下声明，并接受有关单位和客户的监督。

1、遵守国家的各项法律、法规、政策，严格执行有关标准，规范及细则等技术文件开展检测工作，以诚实、公正的态度确保检测工作质量，并对检测结果负责。

2、公司具有固定的工作和检验检测场所，拥有与开展的检测工作相匹配的专业技术、管理人员，拥有相关检测所需的设备设施。

3、承诺对客户的技术、资料、数据和其他商业机密严格保密，切实维护客户的权益，绝不利用客户的技术和资料从事技术开发和技术服务。

4、承诺对所有委托方一视同仁，提供相同的优质、高效服务，保证检测数据和结果的真实、客观、准确。

5、承诺出具的检验检测数据、结果独立于所涉及的利益相关方，不受任何可能干扰其技术判断因素的影响，确保检验检测数据、结果的真实、客观、准确。

以上声明，本公司全体人员必须严格遵守。

成都奥创生物科技有限公司

目录

[一、 样本信息 8](#_Toc27646)

[二、 实验简介 8](#_Toc21350)

[三、 实验仪器，试剂耗材 8](#_Toc14117)

[四、 实验步骤 9](#_Toc8523)

[五、 染色结果 11](#_Toc939)

# 样本信息

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样本编号 | 样本来源 | 样本类型 | 样本量 |
|  |  |  |  |

# 实验简介

TUNEL染色是检测细胞凋亡染色的常见方法，其原理是细胞在发生凋亡时，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) 的催化下加上荧光素、生物素标记的dUTP，从而可以通过荧光显微镜或化学显色方法检测细胞凋亡的情况。

# 实验仪器，试剂耗材

3.1仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **仪器名称** | **品牌** | **型号** |
| 组织脱水机 | 武汉俊杰电子 | JT-12S |
| 石蜡包埋机 | 武汉俊杰电子 | JB-L5 |
| 病理切片机 | 上海徕卡仪器 | RM2016 |
| 冻台 | 武汉俊杰电子 | JB-L5 |
| 组织摊片机 | 武汉俊杰电子 | JK-5/6 |
| 烤箱 | 绍兴泸越 | 101-3B |
| 微波炉 | 格兰仕微波炉电器有限公司 | P70D20TL-P4 |
| 脱色摇床 | 谷歌生物 | TSY-B |
| 涡旋混合器 | 谷歌生物 | MX-F |
| 掌上离心机 | 谷歌生物 | D1008E |
| 移液枪 | Dragon | KE0003087/KA0056573 |
| 组化笔 | Gene tech | GT1001 |
| 冰箱 | 青岛海尔股份有限公司 | BCD-192TGN |
| 荧光生物显微镜 | 广州市明美光电技术有限公司 | MF23-M |

3.2试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **厂家** | **货号** |
| PBS缓冲液 | servicebio | G0002 |
| 4%多聚甲醛 | biosharp | BL539A |
| 山羊血清 | 索莱宝 | SL038 |
| 一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(FITC/TMR) | servicebio | G1501/G1502 |
| 一抗 | / | / |
| 二抗 | biosharp | / |
| 破膜液 | biosharp | BS084-100ml |
| DAPI | biosharp | BS097-10mg |
| 自发荧光淬灭剂B液 | / | / |

3.3耗材

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **厂家** | **货号** |
| 粘附性载玻片 | 江苏世泰 | 80312/80302 |
| 显微镜盖玻片 | 江苏世泰 | 80340-1630 |
| 病理刀片 | epredia | MX35 ULTRA |
| 组织包埋盒 | 江苏世泰 | 22022 |

# 实验步骤

4.1石蜡切片脱蜡至水，春夏秋：二甲苯I 10min-二甲苯II 10min-二甲苯III 10min-无水乙醇I 5min-无水乙醇II 5min-95%乙醇 5min-85%乙醇 5min-75%乙醇 5min-纯水 5min。冬天：二甲苯每缸时间延长至15min。

4.2修复；配制Proteinase K工作液：按1：9体积比，用PBS作为稀释液来稀释Proteinase K（200 µg/mL）原液，使其终浓度为20 μg/mL；每个样本上滴加100 μL上述Proteinase K工作液，完全覆盖组织，37℃孵育20 min,用PBS溶液浸润清洗样本3次，每次5 min（Proteinase K需洗涤干净，否则会干扰后续的标记反应），处理后的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

4.3破膜；切片稍甩干后在圈内滴加破膜工作液(0.5%TritonX-100)覆盖组织，常温下孵育20min，将玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

4.4平衡；每个样本滴加50 μL Equilibration Buffer使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育10 min。

4.5标记；在冰上解冻Biotin-dUTP Labeling Mix和Equilibration Buffer，并按照Recombinant TdT enzyme：Biotin-dUTP Labeling Mix：Equilibration Buffer=1 µL：5 µL：50 µL（1：5：50）比例混合足够用于所有实验的TdT孵育缓冲液，具体实验使用试剂的体积可以根据玻片的大小进行适当等比例调整，尽量去掉平衡的Equilibration Buffer，然后在每份组织样本上加入56 μL TdT孵育缓冲液，在37℃孵育1 h；注意不能干片，载玻片要避光。将玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤4次，每次5min。

4.6血清封闭，切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加5%山羊血清均匀覆盖组织，室温封闭30min。

4.7孵育一抗，轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加PBS按一定比例配好的一抗，切片平放于湿盒内4°C孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 稀释比 | 品牌 | 货号 |
| / | / | / | / |
| / | / | / | / |
| / | / | / | / |
| / | / | / | / |

4.8孵育二抗，玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。切片稍甩干后在圈内滴加组化试剂盒内与一抗相应种属的二抗（CY3/FITC标记）覆盖组织，室温孵育50min，避光，将玻片置于盛有PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 稀释比 | 品牌 | 货号 |
| / | / | / | / |

4.9DAPIA复染细胞核；玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤4次，每次5min。切片稍甩干后在圈内滴加DAPI染液，避光室温孵育5min。玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤4次，每次5min。

4.10免疫标记后的自发荧光淬灭；滴加组织自发荧光淬灭剂B液覆盖组织室温避光孵育5 min，流水冲洗3min。

4.11封片；切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。

4.12镜检。

# 染色结果

在荧光显微镜下分析样本，载玻片注意避光，DAPI能将凋亡和未凋亡的细胞都染成蓝色，只在凋亡的细胞核中才有FITC-12-dUTP/TMR-5-dUTP掺入而定位的绿色/红色荧光。（DAPI紫外激发波长330-380nm，发射波长420nm，发蓝光；FITC激发波长465-495nm，发射波长515-555 nm，发绿光。CY3激发波长510-560，发射波长590nm，发红光。）