

Calbiochem®

**FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit,
Fluorescent-TdT Enzyme**
目录货号 QIA39

背景介绍:

细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象，在生物体进化、内环境的稳定以及系统发育中发挥着重要的作用。细胞凋亡发生在正常的细胞周期循环中，并发生形态学和生理生化的特征性改变，比如细胞皱缩，细胞间连接消失，线粒体膜电位消失，通透性改变，核质浓缩，核膜核仁破碎，DNA降解成为约 180bp-200bp 的片段；胞膜有小泡状突起，膜内侧磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面，胞膜结构仍保持完整，最终凋亡细胞遗骸被分割包裹为几个凋亡小体，并迅速被周围专职或非专职吞噬细胞吞噬。以上改变发生在不同的细胞凋亡阶段。

检测原理:

在凋亡晚期细胞中，DNA 会被降解为不同大小的片段，正常的或正在增殖的细胞则几乎没有 DNA 的断裂，该方法是将荧光素（Fluorescein）标记和未标记的 dNTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT 酶）的作用下，连接到凋亡细胞中断裂 DNA 片段的 3'-OH 末端，然后进行荧光显微镜或流式细胞仪检测。**试剂盒对标记反应进行了优化，采用最佳比例的荧光素标记和未标记的 dNTP 进行 3'-OH 末端的核苷酸掺入，使得同一个断裂的 DNA 片段末端可以形成更长的“标记尾巴”，该“标记尾巴”减少了相邻掺入 dNTP 上标记基团的空间位阻，增加每个断裂片段后的荧光基团数目，降低荧光基团相邻后可能造成的聚集和淬灭，从而提高检测灵敏度，减少非特异性反应。**此外试剂盒提供的封片剂中含有 DAPI 核染料，可以将全部标记和未标记细胞的 DNA 着色，并在 330-380nm 波长激发光下发出荧光，从而得以判断凋亡细胞占总细胞比例。封片剂还可以稳定和增强荧光信号，减少淬灭，从而提高检测的灵敏度。

检测次数: 50 次

检测方法: 荧光显微镜或流式细胞仪

样本类型: 石蜡包埋组织切片、组织冰冻切片、细胞涂片以及细胞悬液

种属反应: 一系列不同种属

储存与运输条件: 试剂盒需用干冰运输并储存在-20℃非无霜冰箱中

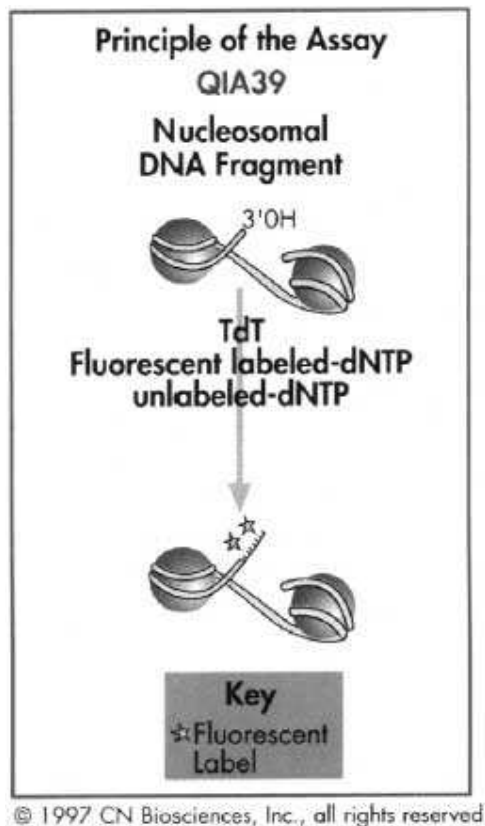


图 1. 试剂盒检测原理图

试剂盒组分:

- (1) 蛋白酶 K (PROTEINASE K)：用来消化细胞，增加样本的通透性。
- (2) 5×TdT 平衡缓冲液 (5X TdT EQUILIBRATION BUFFER)：使用前需稀释 5 倍。
- (3) 荧光素片段末端标记反应混合物 (FLUORESCHEIN-FragEL™ LABELING REACTION MIX)：标记和未标记的脱氧核糖核苷酸以最佳的比例混合，在末端脱氧核糖核苷酸转移酶 (TdT 酶) 的作用下标记 DNA 片段末端。
- (4) MOUNTING MEDIA：水性封片剂，含 DAPI 核染料。用于维持和增强荧光信号，并通过染色所有细胞的细胞核 DNA 从而观察样本中的全体细胞。
- (5) HL-60 细胞阳性/阴性对照片：提供两张相似的固定细胞甩片，都是用 0.5μg/ml 放线菌素 D 处理 19 小时的 HL-60 细胞，含有已诱导凋亡细胞和未凋亡细胞，可作为凋亡阳性和阴性对照。
- (6) TdT 酶 (TdT ENZYME)：将标记和未标记的脱氧核糖核苷酸掺入断裂的 DNA 3'-OH 末端。
注意：TdT 酶在 -20℃ 保存时不会凝固，因此不需要提前取出融化，只需在使用前迅速从 -20℃ 冰箱中拿出取用后立即放回 -20℃ 保存。
注意：其他组分也在使用后尽快放回 -20℃ 冰箱保存。为了避免试剂损失，使用前可以低速短暂离心融化后的试剂，然后小心开管取用。

实验准备:

实验需用到的仪器耗材有: 荧光显微镜、小型染色缸、湿盒(塑料/玻璃容器与吸水纸)、冰盒、洗瓶、盖玻片、封口膜、各种规格的移液器及枪头等。

除试剂盒提供的组分外, 需自备的实验试剂有: 二甲苯、梯度稀释乙醇溶液(100%、90%、80%、70%)、10mM Tris 溶液(pH8.0)、TBS 缓冲液、DNA 酶 I、MgSO₄ 等。

注意事项:

为了获得最佳的实验结果, 请在操作前认真阅读以下注意事项。

- (1) TdT 酶在-20℃保存时不会凝固, 因此不需要提前取出融化, 只需在使用前迅速从-20℃冰箱中拿出取用后立即放回保存; 其他组分除封片剂外, 在使用时还需放置在冰上, 并在使用后尽快放回-20℃冰箱保存。为了避免试剂损失, 使用前可以低速短暂离心融化后的试剂, 然后小心开管取用。避免不必要的反复冻融。
- (2) 由于封片剂中含致癌、致畸物质, 并可能伤害皮肤和眼睛, 因此在封片操作前必须穿戴好手套、实验服和护目镜。不要吞咽。
- (3) 针对不同的样本类型, 比如石蜡包埋组织切片, 组织冰冻切片、固定细胞片以及细胞悬液等, 各有不同的操作流程, 请根据实验的样本类型参考相应的操作流程。对照的 HL-60 细胞片需按照固定细胞片的操作流程操作。
- (4) 蛋白酶 K 孵育时间, DNase I 处理时间及标记反应时间需根据细胞类型, 样本制备步骤**摸索最适条件**。以说明书中的条件为初始参考标准。
- (5) 在标记反应中, 推荐使用盖片或封口膜覆盖样本, 保证反应液均匀分布, 并避免孵育过程中缓冲液蒸发损失。准备覆盖膜时, 可剪下一片 Parafilm®封口膜, 使其稍大于样本, 并将一角折起便于在接下来实验步骤中取放。
- (6) 用塑料或玻璃容器及纸巾自制湿盒, 在样本处理过程中使用湿盒保持样本存放环境的湿润, **一定避免样本干燥**。
- (7) 悬浮细胞可用以下方法固定或贴附在玻片上: 4℃缓慢离心(1000rpm) 5 分钟, 去除细胞培养上清, 并将细胞重新悬浮在 4%的甲醛溶液(溶于 1×PBS 溶液)使其终密度为 1×10⁶/ml, 室温孵育 10 分钟。按照上述方法离心收集细胞, 去除固定液并用 80%乙醇溶液以相同细胞密度重悬。固定后的细胞可以保存在 4℃。固定后的细胞(100-300μl)可直接固定在玻片上或用 Cytospin®辅助制备细胞片。使用聚 L-赖氨酸包被的玻片可以提高细胞的黏附性。

操作流程:

一 石蜡包埋组织切片处理流程

A. 样本的脱蜡处理

- 1、室温下将石蜡组织切片放入二甲苯中浸泡 5 分钟。更换新的二甲苯再浸泡 5 分钟以彻底脱掉石蜡。
- 2、室温下用 100%乙醇浸泡切片 5 分钟, 更换新的 100%乙醇再浸泡 5 分钟。
- 3、室温下用梯度乙醇(90、80、70%)各浸洗 1 次, 每次 3 分钟, 逐渐增加水分。
- 4、用 1×TBS 轻轻润洗切片, 并用滤纸小心吸干玻片上样本周围多余的液体。这时可用石蜡笔或疏水笔(Cat. #402176)在样品周围描绘样品分布的轮廓, 便于下游透性处理和平衡标记操作。在实验过程中, 切勿让样品干燥。处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

B. 增加样本的通透性

- 1、按 1: 100 的比例, 用 10 mM Tris 溶液(pH8.0)作为稀释液来稀释 2mg/ml 的蛋白酶 K 溶液, 使其终浓度为 20μg/ml。每个样本需要 100μL 蛋白酶 K 溶液(可以将 1μL 的 2mg/ml 蛋白酶 K 溶液加至 99μL 的 10mM Tris 溶液中配制而成)。

2、每个样本上滴加 100 μ L 浓度为 20 μ g/ml 的蛋白酶 K 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 20 分钟。**注意严格控制孵育时间，孵育时间过长可对细胞造成一定的伤害，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。**蛋白酶 K 工作液的使用浓度、处理时间及温度因组织或细胞的类型或固定方法的不同而有所不同，使用者可参照试剂盒提供的标准使用说明摸索最合适的实验条件。

3、用 1 \times TBS 溶液润洗样本。

4、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

C. 样本阳性对照处理

样本阳性对照实验为选做，可根据自身情况分析选做。但试剂盒提供的 HL-60 细胞的阳性/阴性对照片建议操作。

1、取经过预处理（已完成通透性处理）的组织包埋切片，用含有 1 μ g/ μ l 的 DNA 酶 I（Cat. #69164）溶液（含有 1mM MgSO₄ 的 1 \times TBS 溶液）完全覆盖样本，室温孵育 20 分钟。

2、用 1 \times TBS 溶液润洗玻片。

3、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

4、样本阴性对照和试剂盒提供的 HL-60 对照细胞片对照为建议必做实验，其处理方法与样本的处理方法相同，但在平衡和标记反应加入 TdT 酶步骤时用蒸馏水替代 TdT 酶。

D. 平衡和标记反应

1、按 1: 5 的比例用蒸馏水稀释 5 \times TdT 平衡缓冲液（每个样本需用 20 μ l 5 \times 缓冲液和 80 μ l 蒸馏水混合稀释成 100 μ l 缓冲液）。

2、滴加 100 μ l 1 \times TdT 平衡缓冲液使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 10-30 分钟。或者将载玻片放入一个含有 1 \times TdT 平衡缓冲液的缸中，保证缓冲液没过样本。在等待孵育的同时准备标记反应混合物。

3、把 TdT 酶从冰箱中取出，为了减少试剂损耗，在打开管盖前需短暂离心试管。将置于冰上的洁净离心管一一做好标记，用移液器准确加入 57 μ l 荧光素片段末端标记反应混合物

（FLUORESC EIN-FragEL™ LABELING REACTION MIX）和 3 μ l TdT 酶（TdT ENZYME），轻轻吹打混匀备用。阴性对照的标记反应混合物中不加 TdT 酶，而用蒸馏水替代。

4、轻轻吸干样本周围的 1 \times TdT 平衡缓冲液，注意不要触碰到样本。

5、在每个样本上立即滴加 60 μ l 上述准备的 TdT 标记反应混合物。

6、用预先裁剪好的比样本稍大的 Parafilm® 封口膜覆盖样本。注意：可将封口膜折起一角以便于取放。封口膜的使用不仅可以确保反应混合物的均匀分布，也能减少孵育过程中的液体蒸发。

7、将切片置于湿盒中于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60-90 分钟。

E. 终止与结果评断

1、移走 Parafilm® 封口膜，并将切片置于 1 \times TBS 溶液中室温孵育 1 分钟。

2、轻轻去掉多余液体，换用新鲜的 1 \times TBS 溶液室温孵育 1 分钟。重复该步骤 1 次。

3、用滤纸轻轻擦掉样本周围及背面的 TBS 溶液。

4、逐滴滴加 Mounting Media 封片剂并盖上盖玻片。

5、在盖玻片的边缘擦掉多余的 Mounting Media，用指甲油密封边缘。Mounting Media 中含有的 DAPI 染料可与细胞 DNA 特异结合并染色，并可用适于 DAPI 的滤光片观察样本中的全体细胞。DAPI 可使所有标记和未标记的细胞在 330-380nm 波长处被激发荧光，从而观察到所有细胞。

6、用标准的绿色荧光滤光片，可在 465-495nm 波长下激发并对被标记的凋亡细胞进行分析。在此条件下，被标记上的细胞会发出亮绿色荧光。注意，在 HL-60 对照片中凋亡细胞和样本阳性对照有特异绿色荧光信号、HL-60 对照片中未凋亡细胞和样本阴性对照没有特异绿色荧光信号的情况下，才可判定结果有效。

- 7、统计凋亡细胞数和细胞总数并计算出细胞凋亡率。
- 8、样本可在 4℃ 下避光保存。

二 组织冰冻切片处理流程

该操作流程与石蜡包埋组织切片相似，除了将脱蜡步骤替换为短暂的水化步骤，并将蛋白酶 K 的处理时间缩短到 10 分钟。在进行该实验检测前需固定冰冻组织。为了避免在清洗步骤中的样本在玻片上损失，**建议不用洗瓶清洗**，而是将玻片浸在 1×TBS 溶液中 2-3 次进行清洗。**注意：在操作中避免样本干燥!!!**

A. 组织固定与水化

- 1、将玻片浸没在 4% 甲醛溶液（溶于 1×PBS）中，室温孵育 15 分钟。
- 2、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。
- 3、将玻片浸没在 1×TBS 溶液中，室温孵育 15 分钟。
- 4、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。这时可用石蜡笔或疏水笔（Cat. #402176）在样品周围描绘样品分布的轮廓，便于下游透性处理和平衡标记操作。

B. 增加样本通透性

- 1、按 1: 100 的比例，用 10 mM Tris 溶液（pH8.0）作为稀释液来稀释 2mg/ml 的蛋白酶 K 溶液，使其终浓度为 20μg/ml。每个样本需要 100μL 蛋白酶 K 溶液（可以将 1μL 的 2mg/ml 蛋白酶 K 溶液加至 99μL 的 10mM Tris 溶液中配制而成）。
- 2、每个样本上滴加 50-100μL 浓度为 20μg/ml 的蛋白酶 K 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 10 分钟。注意严格控制孵育时间，孵育时间过长可对细胞造成一定的伤害，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。蛋白酶 K 工作液的使用浓度、处理时间及温度因组织或细胞的类型或固定方法的不同而有所不同，使用者可参照试剂盒提供的标准使用说明摸索最合适的实验条件。
- 3、在盛有 1×TBS 溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本 2-3 次。
- 4、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

C. 样本阳性对照处理

样本阳性对照实验为选做，可根据自身情况分析选做。但试剂盒提供的 HL-60 细胞的阳性/阴性对照片建议操作。

- 1、取经过预处理（已完成通透性处理）的组织包埋切片，用含有 1μg/μl 的 DNA 酶 I（Cat. #69164）溶液（含有 1mM MgSO₄ 的 1×TBS 溶液）完全覆盖样本，室温孵育 20 分钟。
- 2、用 1×TBS 溶液润洗载玻片。
- 3、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。
- 4、样本阴性对照和试剂盒提供的 HL-60 对照细胞片对照为建议必做实验，其处理方法与样本的处理方法相同，但在平衡和标记反应加入 TdT 酶步骤时用蒸馏水替代 TdT 酶。

D. 平衡和标记反应

- 1、按 1: 5 的比例用蒸馏水稀释 5×TdT 平衡缓冲液（每个样本需用 20μl 5×缓冲液和 80μl 蒸馏水混合稀释成 100μl 缓冲液）。
- 2、滴加 100μl 1×TdT 平衡缓冲液使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 10-30 分钟。或者将载玻片放入一个含有 1×TdT 平衡缓冲液的缸中，保证缓冲液没过样本。在等待孵育的同时准备标记反应混合物。
- 3、把 TdT 酶从冰箱中取出，为了减少试剂损耗，在打开管盖前需短暂离心试管。将置于冰上的洁净离心管一一做好标记，用移液器准确加入 57μl 荧光素片段末端标记反应混合物

(FLUORESC EIN-FragEL™ LABELING REACTION MIX) 和 3 μ l TdT 酶 (TdT ENZYME)，轻轻吹打混匀备用。阴性对照的标记反应混合物中不加 TdT 酶，而用蒸馏水替代。

- 4、轻轻吸干样本周围的 1 \times TdT 平衡缓冲液，注意不要触碰到样本。
- 5、在每个样本上立即滴加 60 μ l 上述准备的 TdT 标记反应混合物。
- 6、用预先裁剪好的比样本稍大的 Parafilm® 封口膜覆盖样本。注意：可将封口膜折起一角以便于取放。封口膜的使用不仅可以确保反应混合物的均匀分布，也能减少孵育过程中的液体蒸发。
- 7、将切片置于湿盒中于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60-90 分钟。

E. 终止与结果评断

- 1、移走 Parafilm® 封口膜，并将切片置于 1 \times TBS 溶液中室温孵育 1 分钟。
- 2、轻轻去掉多余液体，换用新鲜的 1 \times TBS 溶液室温孵育 1 分钟。重复该步骤 1 次。
- 3、用滤纸轻轻擦掉样本周围及背面的 TBS 溶液。
- 4、逐滴滴加 Mounting Media 封片剂并盖上盖玻片。
- 5、在盖玻片的边缘擦掉多余的 Mounting Media，用指甲油密封边缘。Mounting Media 中含有的 DAPI 染料可与细胞 DNA 特异结合并染色，并可用适于 DAPI 的滤光片观察样本中的全体细胞。DAPI 可使所有标记和未标记的细胞在 330-380nm 波长处被激发荧光，从而观察到所有细胞。
- 6、用标准的绿色荧光滤光片，可在 465-495nm 波长下激发并对被标记的凋亡细胞进行分析。在此条件下，被标记上的细胞会发出亮绿色荧光。注意，在 HL-60 对照片中凋亡细胞和样本阳性对照有特异绿色荧光信号、HL-60 对照片中未凋亡细胞和样本阴性对照没有特异绿色荧光信号的情况下，才可判定结果有效。
- 7、统计凋亡细胞数和细胞总数并计算出细胞凋亡率。
- 8、样本可在 4 $^{\circ}$ C 下避光保存。

三 固定细胞片处理流程

该操作流程与冰冻组织切片相似，除了将蛋白酶 K 的处理时间缩短到 5 分钟。将悬浮细胞固定到玻片上的操作请参考“**注意事项**”章节。为了避免在清洗步骤中的样本在玻片上损失，**建议不用洗瓶清洗**，而是将玻片浸在 1 \times TBS 溶液中 2-3 次进行清洗。**注意：在操作中避免样本干燥！！**

A. 水化

- 1、将玻片浸没在 1 \times TBS 溶液中，室温孵育 15 分钟。
- 2、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。这时可用石蜡笔或疏水笔 (Cat. #402176) 在样品周围描绘样品分布的轮廓，便于下游透性处理和平衡标记操作。

B. 增加样本通透性

- 1、按 1: 100 的比例，用 10 mM Tris 溶液 (pH8.0) 作为稀释液来稀释 2mg/ml 的蛋白酶 K 溶液，使其终浓度为 20 μ g/ml。每个样本需要 100 μ L 蛋白酶 K 溶液 (可以将 1 μ L 的 2mg/ml 蛋白酶 K 溶液加至 99 μ L 的 10mM Tris 溶液中配制而成)。
- 2、每个样本上滴加 50-100 μ L 浓度为 20 μ g/ml 的蛋白酶 K 溶液，使其被全部覆盖，室温孵育 5 分钟。注意严格控制孵育时间，孵育时间过长可对细胞造成一定的伤害，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。蛋白酶 K 工作液的使用浓度、处理时间及温度因组织或细胞的类型或固定方法的不同而有所不同，使用者可参照试剂盒提供的标准使用说明摸索最合适的实验条件。
- 3、在盛有 1 \times TBS 溶液的敞口烧杯中浸没清洗样本 2-3 次。
- 4、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。

C. 样本阳性对照处理

样本阳性对照实验为选做，可根据自身情况分析选做。但试剂盒提供的 HL-60 细胞的阳性/阴性对照片建议操作。

- 1、取经过预处理（已完成通透性处理）的组织包埋切片，用含有 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 DNA 酶 I（Cat. #69164）溶液（含有 1mM MgSO_4 的 $1\times\text{TBS}$ 溶液）完全覆盖样本，室温孵育 20 分钟。
- 2、用 $1\times\text{TBS}$ 溶液润洗载玻片。
- 3、轻轻去掉多余液体，并用滤纸小心吸干载玻片上样本周围的液体。处理好的样本放在湿盒中保持样本的湿润。
- 4、样本阴性对照和试剂盒提供的 HL-60 对照细胞片对照为建议必做实验，其处理方法与样本的处理方法相同，但在平衡和标记反应加入 TdT 酶步骤时用蒸馏水替代 TdT 酶。

D. 平衡和标记反应

- 1、按 1: 5 的比例用蒸馏水稀释 $5\times\text{TdT}$ 平衡缓冲液（每个样本需用 $20\mu\text{l}$ $5\times$ 缓冲液和 $80\mu\text{l}$ 蒸馏水混合稀释成 $100\mu\text{l}$ 缓冲液）。
- 2、滴加 $100\mu\text{l}$ $1\times\text{TdT}$ 平衡缓冲液使其全部覆盖待检样本区域，室温孵育 10-30 分钟。或者将载玻片放入一个含有 $1\times\text{TdT}$ 平衡缓冲液的缸中，保证缓冲液没过样本。在等待孵育的同时准备标记反应混合物。
- 3、把 TdT 酶从冰箱中取出，为了减少试剂损耗，在打开管盖前需短暂离心试管。将置于冰上的洁净离心管一一做好标记，用移液器准确加入 $57\mu\text{l}$ 荧光素片段末端标记反应混合物（FLUORESC EIN-FragEL™ LABELING REACTION MIX）和 $3\mu\text{l}$ TdT 酶（TdT ENZYME），轻轻吹打混匀备用。阴性对照的标记反应混合物中不加 TdT 酶，而用蒸馏水替代。
- 4、轻轻吸干样本周围的 $1\times\text{TdT}$ 平衡缓冲液，注意不要触碰到样本。
- 5、在每个样本上立即滴加 $60\mu\text{l}$ 上述准备的 TdT 标记反应混合物。
- 6、用预先裁剪好的比样本稍大的 Parafilm® 封口膜覆盖样本。注意：可将封口膜折起一角以便于取放。封口膜的使用不仅可以确保反应混合物的均匀分布，也能减少孵育过程中的液体蒸发。
- 7、将切片置于湿盒中于 37°C 孵育 60-90 分钟。

E. 终止与结果评断

- 1、移走 Parafilm® 封口膜，并将切片置于 $1\times\text{TBS}$ 溶液中室温孵育 1 分钟。
- 2、轻轻去掉多余液体，换用新鲜的 $1\times\text{TBS}$ 溶液室温孵育 1 分钟。重复该步骤 1 次。
- 3、用滤纸轻轻擦掉样本周围及背面的 TBS 溶液。
- 4、逐滴滴加 Mounting Media 封片剂并盖上盖玻片。
- 5、在盖玻片的边缘擦掉多余的 Mounting Media，用指甲油密封边缘。Mounting Media 中含有的 DAPI 染料可与细胞 DNA 特异结合并染色，并可用适于 DAPI 的滤光片观察样本中的全体细胞。DAPI 可使所有标记和未标记的细胞在 330-380nm 波长处被激发荧光，从而观察到所有细胞。
- 6、用标准的绿色荧光滤光片，可在 465-495nm 波长下激发并对被标记的凋亡细胞进行分析。在此条件下，被标记上的细胞会发出亮绿色荧光。注意，在 HL-60 对照片中凋亡细胞和样本阳性对照有特异绿色荧光信号、HL-60 对照片中未凋亡细胞和样本阴性对照没有特异绿色荧光信号的情况下，才可判定结果有效。
- 7、统计凋亡细胞数和细胞总数并计算出细胞凋亡率。
- 8、样本可在 4°C 下避光保存。

四 流式细胞术检测细胞悬液处理流程

A. 细胞固定

- 1、 4°C 缓慢离心（1000rpm）5 分钟，去除培养上清，并将细胞重新悬浮在 4% 的甲醛溶液（溶于 $1\times\text{PBS}$ ）使其终密度为 $1\times 10^6/\text{ml}$ ，室温孵育 10 分钟。按照上述方法离心收集细胞，去除固定液并用 80% 乙醇溶液以相同细胞密度重悬。固定后的细胞可以保存在 4°C 。
- 2、固定细胞可以储存在 4°C （可以稳定保存 2-6 个月）。

3、固定后的细胞（100-300 μ l）可直接固定在玻片上或用 Cytospin®辅助制备细胞片。使用聚 L-赖氨酸包被的玻片可以提高细胞的黏附性。

4、固定后的细胞甩片可以储存在-20°C。

B. 水化

1、将 1ml 固定细胞（ 1×10^6 cells/ml）转移到干净的离心管中。

2、室温缓慢离心（1000rpm）5 分钟，去除乙醇溶液上清。

3、将细胞重悬在 200 μ l 1 \times TBS 溶液中。

4、室温缓慢离心（1000rpm）5 分钟，去除 TBS 溶液。

C. 增加样本通透性

1、按 1: 100 的比例，用 10 mM Tris 溶液（pH8.0）作为稀释液来稀释 2mg/ml 的蛋白酶 K 溶液，使其终浓度为 20 μ g/ml。每个样本需要 100 μ L 蛋白酶 K 溶液（可以将 1 μ L 的 2mg/ml 蛋白酶 K 溶液加至 99 μ L 的 10mM Tris 溶液中配制而成）。

2、将细胞重悬在 100 μ L 20 μ g/ml 的蛋白酶 K 溶液中。室温孵育 5 分钟。注意严格控制孵育时间，孵育时间过长可对细胞造成一定的伤害，过短则可能造成透性处理不充分，影响标记效率。蛋白酶 K 工作液的使用浓度、处理时间及温度因组织或细胞的类型或固定方法的不同而有所不同，使用者可参照试剂盒提供的标准使用说明摸索最合适的实验条件。

3、室温缓慢离心（1000rpm）5 分钟，去除蛋白酶 K 溶液。

D. 平衡和标记反应

1、按 1: 5 的比例用蒸馏水稀释 5 \times TdT 平衡缓冲液（每个样本需用 20 μ l 5 \times 缓冲液和 80 μ l 蒸馏水混合稀释成 100 μ l 缓冲液）。

2、将细胞重悬在 100 μ l 1 \times TdT 平衡缓冲液中。室温孵育 10-30 分钟，等待孵育的同时准备标记反应物。

3、把 TdT 酶从冰箱中取出，为了减少试剂损耗，在打开管盖前需短暂离心试管。将置于冰上的洁净离心管一一做好标记，用移液器准确加入 57 μ l 荧光素片段末端标记反应混合物（FLUORESC EIN-FragEL™ LABELING REACTION MIX）和 3 μ l TdT 酶（TdT ENZYME），轻轻吹打混匀备用。阴性对照的标记反应混合物中不加 TdT 酶，而用蒸馏水替代。

4、孵育结束后，室温缓慢离心（1000rpm）5 分钟，去除平衡缓冲液。

5、将细胞重悬在 60 μ l 标记反应混合物溶液中，37°C 避光孵育 1-1.5 小时。

E. 终止与结果评断

1、室温缓慢离心（1000rpm）5 分钟，去除标记反应混合物。

2、将细胞重悬在 200 μ l 1 \times TBS 溶液中。重复用 TBS 溶液清洗。

3、将细胞重悬在 0.5ml 1 \times TBS 溶液中。

4、在装备有 488nm 氩离子激发光源的流式细胞仪上进行荧光分析。细胞悬液也可以固定在玻片上并用荧光显微镜观察。

检测:

一 用荧光显微镜检测

DAPI 滤光片（激发波长 330-380nm）可以用来观察检测样本中的全体细胞，所有细胞都呈现蓝色荧光（参见图 2），荧光素滤光片（激发波长 465-495nm）观察样本，发出明亮绿色荧光信号的细胞为凋亡细胞（图 2），而暗淡或没有绿色荧光发出的区域则为未凋亡细胞或非凋亡晚期细胞。由于凋亡细胞中含有 3'-OH 末端的 DNA 片段主要集中在细胞核及凋亡小体中，因此可以利用形态学分析结合荧光信号来解释 FragEL™ 的凋亡检测的结果。凋亡过程中典型的形态学改变已经被明确确定和广泛接受（参见图 3 中放线菌素 D 诱导凋亡/Lane 2 和未诱导凋亡/Lane 1 的 HL-60 细胞 DNA Ladder 实验结果），可以用来作为细胞程序化死亡的检测指标，并辅助说明 TUNEL 检测的实验结

果。非凋亡细胞由于缺乏大量的 3'-OH 末端，因此不会被显著掺入和标记荧光素基团。标记反应后，用荧光显微镜仔细观察试剂盒中提供的 HL-60 细胞对照片，会得到如下结果：对照片中由于放线菌素 D 的诱导，既含有凋亡细胞，也有正常细胞。在组织切片样本中，很难观察到胞膜的突起或起泡，许多凋亡细胞的胞核呈现圆形或椭圆形，保存完好的凋亡小体有时可以观察到。由于凋亡是一个非同步发生的过程，组织中的凋亡细胞可能呈散在分布而非像坏死细胞一样呈连续或成群地分布。

图 2. HL-60 细胞阳性/阴性对照片

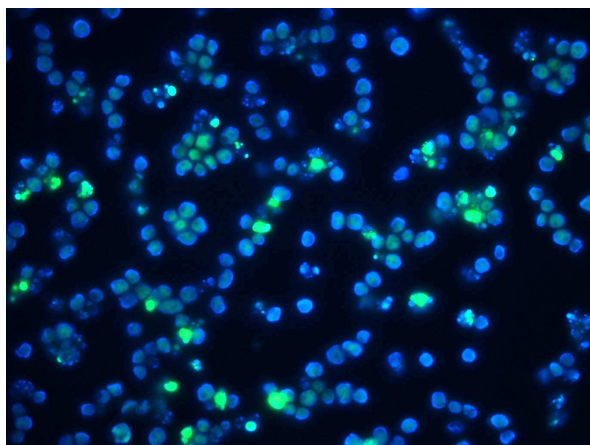
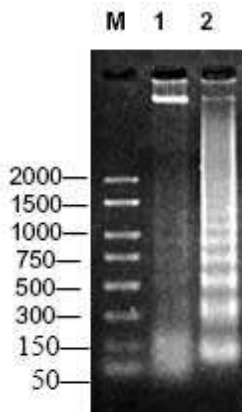


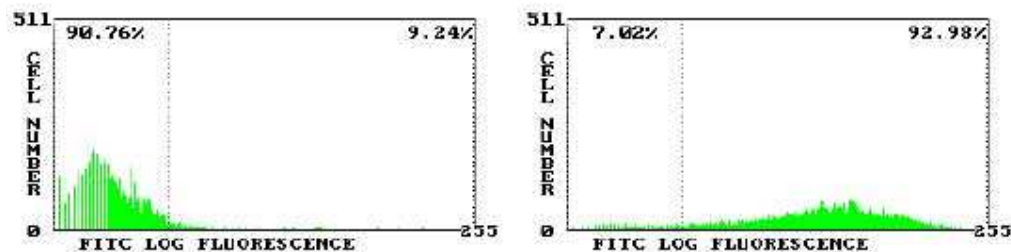
图 3. HL-60 细胞 DNA Ladder 结果



二 用流式细胞仪观察

用装备有 488nm 氩离子激发光源的流式细胞仪检测标记后的细胞悬液，发射波长是 517nm。为了设定流式细胞仪的相关检测参数，可同时使用凋亡诱导和未诱导细胞。图 4 显示了一个单参数的检测直方图。凋亡细胞的存在可以通过右图中荧光强度沿 X 轴向右偏移而显示。垂直界线（点线）的设定参考未处理细胞的检测结果，在这样的样本中，可以预见有少量由于培养中正常的细胞死亡而出现的荧光标记。流式细胞仪检测中光散射参数的改变同样可以用来监测和判断细胞凋亡情况的发生。例如，未处理的悬浮细胞大多有很高的前向散射值，但诱导出现凋亡后，由于细胞皱缩和膜起泡，侧向散射将大大增强。结合光散射参数的改变及 TUNEL 标记实验的检测结果，往往可以确定或互相印证用单个方法得到的结论。

图 4 流式细胞仪检测正常细胞与凋亡细胞结果



HL-60 细胞用 0.5µg/ml 的放线菌素 D 处理（右侧）或未经任何处理（左侧），按照细胞悬液处理流程处理细胞并用流式细胞仪检测。

引用文献:

Alana A. Shigeoka, Amanpreet Kambo, John C. Mathison, Andrew J. King, Wesley F. Hall, Jean da Silva Correia, Richard J. Ulevitch, and Dianne B. McKay(2010) Nod1 and Nod2 Are Expressed in Human and Murine Renal Tubular Epithelial Cells and Participate in Renal Ischemia Reperfusion Injury. *The Journal of Immunology*, 184: 2297 -2304

Paola A. Erba¹, Chiara Manfredi¹, Elena Lazzeri¹, Fabrizio Minichilli², Ernest K.J. Pauwels^{1,3}, Alberto Sbrana⁴, H. William Strauss⁵ and Giuliano Mariani(2010) Time Course of Paclitaxel-Induced Apoptosis in an Experimental Model of Virus-Induced Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(5): 775-781

Michalis Fragkos, Jaana Jurvansuu, and Peter Beard. H2AX Is Required for Cell Cycle Arrest via the p53/p21 Pathway(2010). *Molecular and Cellular Biology*, 29(10): 2828-2840

T. V. Satish Tammana, Amogh A. Sahasrabudhe, Virendra K. Bajpai and Chhitar M. Gupta(2010). ADF/cofilin-driven actin dynamics in early events of Leishmania cell division. *Journal of Cell Science* 123: 1894-1901

Hiromitsu Kanamori, Genzou Takemura, Rumi Maruyama, Kazuko Goto, Akiko Tsujimoto, Atsushi Ogino, Longhu Li, Itta Kawamura, Toshiaki Takeyama, Tomonori Kawaguchi, Kenshi Nagashima, Takako Fujiwara, Hisayoshi Fujiwara, Mitsuru Seishima and Shinya Minatoguchi(2009) Functional Significance and Morphological Characterization of Starvation-Induced Autophagy in the Adult Heart. *American Journal of Pathology*. 174:1705-1714.

Javier Munoz-Luque, Josefa Ros, Guillermo Fernandez-Varo, Sonia Tugues, Manuel Morales-Ruiz, Carlos E. Alvarez, Scott L. Friedman, Vicente Arroyo, and Wladimiro Jimenez(2008) Regression of Fibrosis after Chronic Stimulation of Cannabinoid CB2 Receptor in Cirrhotic Rats. *JPET* 324(2): 475-483

Truus Roelandt, Carol Heughebaert and Jean-Pierre Hachem(2008) Proteolytically Active Allergens Cause Barrier Breakdown. *Journal of Investigative Dermatology*, 128: 1878-1880.

Kenneth W. Adams and Geoffrey M. Cooper(2007) Rapid Turnover of Mcl-1 Couples Translation to Cell Survival and Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 6192-6200.

Theo Hatzipetros,¹ Jamie G. Raudensky,¹ Jean-Jacques Soghomonian,² and Bryan K. Yamamoto(2007) Haloperidol Treatment after High-Dose Methamphetamine Administration Is Excitotoxic to GABA Cells in the Substantia Nigra Pars Reticulata. *The Journal of Neuroscience*, 27(22):5895-5902



Lili A. Barouch, Daqing Gao, Lei Chen, Karen L. Miller, Wenhong Xu, Alexander C. Phan, Michelle M. Kittleson, Khalid M. Minhas, Dan E. Berkowitz, Chiming Wei, Joshua M. Hare(2006) Circulation Research, 98: 119-124.

Nica M. Borradaile, Kimberly K. Buhman, Laura L. Listenberger, Carolyn J. Magee, Emiko T.A. Morimoto, Daniel S. Ory, and Jean E. Schaffer(2006) A Critical Role for Eukaryotic Elongation Factor 1A-1 in Lipotoxic Cell Death. Molecular Biology of the Cell. 17: 770-778