

中文说明书

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System

适用产品目录号：G3250



DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。

电子邮箱: chinatechserv@promega.com

1. 产品描述	2
2. 产品组分和储存条件	4
3. 注意事项	4
3. A. 光敏性	4
3. B. 安全性	4
4. 实验操作步骤	5
4. A. 在贴壁细胞中进行凋亡分析的实验步骤	7
4. B. 石蜡包埋组织的预处理	9
4. C. 用流式细胞术检测悬浮细胞的步骤	10
4. D. 荧光显微镜检测悬浮细胞的步骤	11
4. E. DNA 酶处理的阳性对照的步骤 (可选)	11
5. 操作实例: 喜树碱 (CAMPTOTHECIN) 或茴香霉素 (ANISOMYCIN) 诱导的 HL-60 细胞凋亡分析	12
6. 疑难解答	14
7. 缓冲液和溶液的成分	15
8. 相关产品	16
9. 参考文献	18

1. 产品描述

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System^(a) 用于特异检测和定量分析细胞群中的凋亡细胞。该系统是非放射性的，可方便、准确和快速地在单细胞水平或细胞悬液中原位检测凋亡细胞。该系统可在多种样品中检测凋亡形式的细胞死亡，如培养的细胞和甲醛固定、石蜡包埋的组织切片。DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System 检测的是核 DNA 断裂，它在许多细胞类型中是凋亡的一个重要生化标志。

当不再被需要或者已严重受损时，大部分高等真核生物的细胞具有通过激活内在的细胞自杀程序而自我破坏的能力。这种正常的生理过程被称为程序性细胞死亡。凋亡一词最初的定义包括某些形态特征，如膜起泡、核和细胞质收缩及染色质固缩。自从其最初定义以来，凋亡一词已广泛用于程序性细胞死亡的所有生化和形态特征。

因凋亡而死亡的细胞经常会分割成膜结合的凋亡小体，这些凋亡小体很容易被巨噬细胞或邻近细胞吞噬并消化，而不产生炎症反应。这与被称为坏死的细胞死亡类型相反，坏死的特点是细胞肿胀、染色质絮凝、膜的完整性丧失、细胞裂解和发生局部炎症反应。

凋亡在稳态 (homeostasis) 的发展和维持以及神经和免疫系统的成熟过程中起重要作用。它也是机体的主要防御机制，可清除机体不需要的和有潜在危险的细胞，如自身反应性淋巴细胞、病毒感染的细胞和肿瘤细胞。与其有益作用相反，细胞凋亡若不恰当的激活则可能助长多种致病进程，例如艾滋病中大量的 T 细胞死亡以及阿尔茨海默病和缺血性中风后神经元细胞的损失 (1-8)。

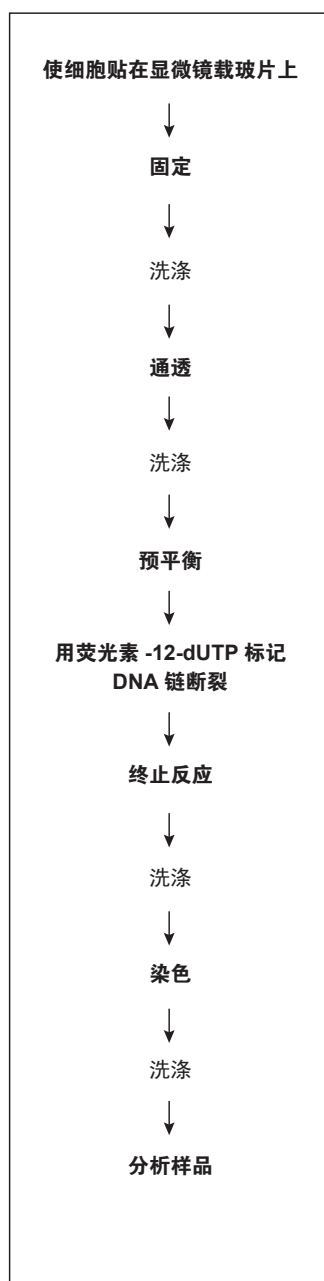
细胞凋亡是遗传控制的过程，在整个进化过程中，细胞凋亡的一些机制至少是部分保守的。进行细胞凋亡的基本机制 (组成性地) 存在于所有哺乳动物中；但是，凋亡过程的激活被认为是由许多生存和死亡信号之间的平衡所调节 (9,10)。

在许多类型的细胞中，凋亡的特征是通过内源性核酸内切酶的作用产生 DNA 断裂片段 (11-14)。凋亡细胞的 DNA 被切成 180-200bp 片段的多聚体 (180-200 bp 整数倍的 DNA 片段)，与寡核小体的大小相符。因此，凋亡细胞的 DNA 通常在琼脂糖凝胶上别具特色地迁移形成一个 180-200bp 多聚体的梯状条带。单链断裂的产生也有报道 (15)。

检测原理：

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System 利用重组末端脱氧核苷酸转移酶 (rTdT 酶) 的催化作用在 DNA 的 3'-羟基 (3'-OH) 末端掺入荧光素-12- dUTP (fluorescein-12-dUTP) 来检测凋亡细胞断裂的 DNA。rTdT 利用 TUNEL (TdT 介导的脱氧三磷酸尿苷缺口末端标记, TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) 原理形成一个多聚尾 (16)。然后，荧光素-12- dUTP 标记的 DNA 可以用荧光显微镜直接观察 (图 1) 或者用流式细胞仪定量 (图 2 和 3)。

流程图



注意事项

在载玻片上培养细胞或将细胞离心涂片 (cytospin) 至载玻片上。

将载玻片浸入配制于 PBS 中的 4% 无甲醇的甲醛中

用 Triton® X-100 通透细胞；用蛋白酶 K 通透组织切片。

加入 Equilibration Buffer；盖上塑料盖玻片 (Plastic Coverslip)。

加入孵育缓冲液 (内含 Equilibration Buffer、Nucleotide Mix 和 rTdT 酶)；盖上塑料盖玻片，并在 37°C 孵育 1 小时。避免光照。

移除塑料盖玻片；将载玻片浸入 2X SSC。

加入碘化丙啶 (propidium iodide) 染所有细胞。或者，在封片液中加入 DAPI 核染料接着进行分析。

用荧光显微镜在红色或蓝色背景下 (分别对应碘化丙啶或 DAPI) 检测凋亡细胞的绿色荧光 (荧光素-12-dUTP)。

图 1. 使用 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL 系统在荧光显微镜下检测贴壁细胞的流程概览

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
DeadEnd™ FluorometricTUNEL System	60 reactions	G3250

包含:

- 9.6ml Equilibration Buffer
- 300µl Nucleotide Mix (6 × 50µl)
- 3 × 20µl Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant
- 70ml 20X SSC
- 10mg Proteinase K
- 60 Plastic Coverslips (塑料盖玻片)

储存条件: 将 Equilibration Buffer (平衡缓冲液)、rTdT 酶和 Proteinase K (蛋白酶 K) 储存于 -20°C。Nucleotide Mix (核苷混合物) 避光储存于 -20°C。这些组分要避免反复冻融。20X SSC 一旦解冻后在室温储存。

本系统提供的蛋白酶 K 在使用前需用 1ml 的蛋白酶 K 缓冲液 (见第 7 节) 溶解。所得到的蛋白酶 K 溶液为 10mg/ml。将配好的蛋白酶 K 溶液分装成小份儿储存于 -20°C, 在 -20°C 该酶至少在六个月内是稳定的。

3. 注意事项

3.A. 光敏性

本系统提供的核苷混合物 (Nucleotide Mix) 对光敏感。核苷混合物以及含有核苷混合物的反应混合物和载玻片要避免直接暴露于光下。

3.B. 安全性

平衡缓冲液中包含二甲胍酸钾 (potassium cacodylate, 二甲次胍酸)。避免接触皮肤和眼睛。**使用该试剂时请戴好手套和安全眼镜。**

4. 实验操作步骤

为确保您为进行该实验做好充分的准备，请在尝试使用 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL 系统之前阅读下述全部材料。溶液成分列在第 7 节。

需用户自备的材料

- PBS
- 碘化丙啶 (Sigma 目录号 P4170)
- 可选: SlowFade® *Light* Anti-Fade Kit (Molecular Probes 目录号 S7461) 或 VECTASHIELD® (Vector Labs 目录号 H-1000)
- 可选: VECTASHIELD® + DAPI (Vector Labs 目录号 H-1200)

如果样品是培养细胞，还需准备：

- 配制于 PBS 中的 1% 无甲醇的甲醛 (Polysciences 目录号 18814)
- 配制于 PBS 中的 4% 无甲醇的甲醛 (Polysciences 目录号 18814)
注意：多聚甲醛可直接替代无甲醇的甲醛。
- 70% 乙醇
- 配制于 PBS 中的 0.2% Triton® X-100 溶液
- 配制于 PBS 中的 0.1% Triton® X-100 溶液，含 5mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA)
- DNA 酶 I (例如，RQ1 RNase-Free Dnase，目录号 M6101)
- 20mM EDTA (pH 8.0)
- DNA 酶缓冲液
- 无 DNA 酶的 RNA 酶 A (DNase-free RNase A)

如果样品是石蜡包埋的组织切片，还需准备：

- 配制于 PBS 中的 4% 无甲醇的甲醛 (Polysciences 目录号 18814)
注意：多聚甲醛可直接替代无甲醇的甲醛。
- 二甲苯
- 乙醇：100%、95%、85%、70% 和 50%，用去离子水稀释
- 0.85% NaCl 溶液
- 蛋白酶 K 缓冲液
- DNA 酶 I
- DNA 酶 I 缓冲液

需用户自备的设备

如果样品是培养的贴壁细胞和组织切片，需准备：

- 多聚赖氨酸 (poly-L-lysine) 包被或硅烷化处理的显微镜载玻片，如 Poly-Prep[®] slides (Sigma 目录号 P0425) 或其它合适的预处理载玻片，如 Superfrost[®] Plus glass slides (Fisher 目录号 12-550-15) 或 Lab-Tek[®] Chamber Slides (Nunc 目录号 177380)
- 细胞刮刀
- 染色缸 (科普林缸, Coplin jars) (可选做的 DNA 酶 I 阳性对照需要用单独的缸)
- 镊子
- 适用于显微镜载玻片的湿盒
- 37℃培养箱
- 微量移液器
- 玻璃盖玻片
- 橡胶胶水或者透明指甲油
- 荧光显微镜

如果样品是细胞悬液，需准备：

- 台式离心机
- 37℃培养箱或 37℃有盖的水浴锅
- 多聚赖氨酸 (poly-L-lysine) 包被或硅烷化处理的显微镜载玻片，如 Poly-Prep[®] slides (Sigma 目录号 P0425) 或其他合适的预处理过的载玻片，如 Superfrost[®] Plus glass slides (Fisher 目录号 12-550-15)
- 染色缸 (科普林缸, Coplin jars) (可选做的 DNA 酶 I 阳性对照实验需要用单独的缸)
- 镊子
- 玻璃盖玻片
- 适用于显微镜载玻片的湿盒
- 微量移液器
- 流式细胞仪或荧光显微镜

4.A. 在贴壁细胞中进行凋亡分析的实验步骤

载玻片的准备

为阳性、阴性对照以及所有的实验样本准备足够数量的多聚赖氨酸包被的载玻片。

多聚赖氨酸包被的载玻片的制备： 吸取 50–100 μ l 的 0.01% w/v (重量体积比) 多聚赖氨酸水溶液 (Sigma 目录号 P9155 或 Sigma 目录号 P8920, 1:10 用水稀释) 滴至每一片预清洗过的玻璃载玻片的表面。在整个将要用于固定细胞的区域中涂布一层薄薄的多聚赖氨酸溶液。载玻片干燥后, 立即用去离子水漂洗, 然后让包被的载玻片在空气中干燥 30-60 分钟。多聚赖氨酸包被的载玻片在使用前可在室温储存数月。

贴壁细胞贴到载玻片上的准备： 在 Lab-Tek[®] 腔室载玻片 (Chamber Slides) 上培养贴壁细胞。在凋亡诱导处理之后, 用 PBS 洗两遍载玻片, 然后直接进行下述的凋亡检测试验。

凋亡检测

- 固定细胞：将载玻片浸入装有新鲜配制于 PBS (pH 7.4) 中的 4% 无甲醇的甲醛的染色缸中, 在 4 $^{\circ}$ C 放置 25 分钟。
注意： 多聚甲醛可直接替代无甲醇的甲醛。
- 洗涤载玻片：将其浸入新鲜的 PBS 中, 在室温放 5 分钟。重复 PBS 洗涤步骤。
注意： 完成第 2 步之后, 载玻片可以在 70% 乙醇中 -20 $^{\circ}$ C 条件下或在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 条件下储存长达两周。
- 通透细胞：将载玻片浸入配制于 PBS 中的 0.2% Triton[®] X-100 溶液中, 放置 5 分钟。
- 洗涤载玻片：将其浸入新鲜的 PBS 中, 在室温放置 5 分钟。重复 PBS 洗涤步骤。
注意： 可选做的使用 DNA 酶 I 的**阳性对照**载玻片可参照 4.E 节中所述在第 4 步进行准备。
- 轻卸载玻片以去掉多余的液体。用 100 μ l Equilibration Buffer (平衡缓冲液) 覆盖细胞。在室温下放置 5-10 分钟进行平衡。
- 在平衡细胞的同时, 在冰上融化 Nucleotide Mix (核苷混合物), 并且依照表 1, 准备足够量的用于所有实验组和可选的阳性对照反应 (见 4.E 节) 的 rTdT 孵育缓冲液。对于面积不大于 5cm² 的一个标准反应, 所需体积是 50 μ l, 用 50 μ l 乘以实验和阳性对照反应的数目来确定所需 rTdT 孵育缓冲液的总体积。对于表面积更大的样本, 可按比例增大试剂体积。
注意： 将 Nucleotide Mix 和 rTdT 孵育缓冲液置于冰上, 避光。

表 1. 准备用于实验组和可选阳性对照反应的 rTdT 孵育缓冲液

缓冲液成分	每 50 μ l 标准反应中各成分的体积		反应数目 (实验反应 + 可选阳性对照)		成分体积
Equilibration Buffer	45 μ l	x	_____	=	_____ μ l
Nucleotide Mix	5 μ l	x	_____	=	_____ μ l
rTdT 酶	1 μ l	x	_____	=	_____ μ l
rTdT 孵育缓冲液总体积				=	_____ μ l

阴性对照：通过混合 45 μ l Equilibration Buffer、5 μ l Nucleotide Mix 和 1 μ l 高压灭菌的去离子水，制备不含 rTdT 酶的对照孵育缓冲液。（阴性对照孵育缓冲液的最终体积足够一份标准的 50 μ l 反应。）按第 7 到 16 步进行阴性对照实验。

阳性对照：如果需要阳性对照的话，请参照第 4.E 节中的可选方案操作。因为在阳性对照反应中使用了 DNA 酶 I，我们建议在之后的步骤中将阳性对照载玻片置于单独的染色缸中处理。

7. 在平衡后的区域周围用吸水纸吸掉 100 μ l Equilibration Buffer 中的绝大部分，然后在 5cm² 区域的细胞上加入 50 μ l rTdT 孵育缓冲液。不要让细胞干掉。

注意：塑料盖玻片在使用前可以切成两半。折起盖玻片的边缘以便于移除和操作。

! 在第 7 步完成之后，载玻片要避光。

8. 把塑料盖玻片盖在细胞上，以确保试剂均匀分布。在湿盒的底部放上用水浸湿的纸巾，将载玻片置于湿盒内，在 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟使发生加尾反应。将湿盒用铝箔覆盖，以避免光照。

9. 用去离子水以 1:10 稀释 20X SSC，加入足量配好的 2X SSC，装满一个标准的染色缸（40ml）。移除塑料盖玻片，将载玻片浸入染色缸的 2X SSC 中，室温放置 15 分钟以终止反应。

! 请确保 20X SSC 中的全部盐类在稀释之前都是溶解的（第 9 步）。

10. 洗涤样本：将载玻片浸入新鲜的 PBS 中，室温放置 5 分钟。重复两次，总共洗三次以去除未掺入的荧光素-12-dUTP。

11. 将载玻片浸入装有 40ml 碘化丙啶溶液的染色缸中，室温避光放置 15 分钟，对样本进行染色。此处碘化丙啶溶液是用 PBS 新鲜配制的，稀释到 1 μ g/ml。

可选操作：省略碘化丙啶的步骤，将载玻片用 VECTASHIELD[®] + DAPI (Vector Lab Cat.# H-1200) 封片以染核。在载玻片上加上盖玻片，然后进行第 16 步。

12. 洗涤样本：将载玻片浸入去离子水中，室温放置 5 分钟。重复两次，总共洗三次。

13. 滴干载玻片上多余的水并且用吸水纸擦拭细胞周边的区域。

14. 如第 16 步所述马上分析样本。或者，在含已处理细胞的区域加上一滴 Anti-Fade solution (Molecular Probes 目录号 S7461)，然后用玻璃盖玻片封片。

15. 用橡胶胶水或透明指甲油封边，然后使其干燥 5-10 分钟。

16. 立即在荧光显微镜下分析样本，用标准的荧光素滤光片在 520 \pm 20nm 处观察荧光素的绿色荧光；在 >620nm 处观察碘化丙啶的红色荧光，以及在 460nm 处观察 DAPI 的蓝色荧光。如有必要，载玻片可在 4 $^{\circ}$ C 黑暗条件下过夜保存。

注意：碘化丙啶将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色。而荧光素-12-dUTP 掺入只在凋亡的细胞核内产生局部绿色荧光。

4.B. 石蜡包埋组织的预处理

组织切片可在甲醛固定和石蜡包埋后用多种技术切成。参考文献 17 提供了一个标准操作步骤。

1. 组织切片（附着于显微镜载玻片上的）脱蜡：将载玻片浸入装有新鲜二甲苯的染色缸中，室温放置 5 分钟。重复一次，总共用二甲苯洗两次。
2. 样本洗涤：将载玻片浸入装有 100% 乙醇的染色缸中，室温放置 5 分钟。
3. 样本重新水化：将载玻片依次浸入梯度乙醇洗液（100%，95%，85%，70%，50%）中，室温下每步放置 3 分钟。
4. 样本洗涤：将载玻片浸入 0.85% NaCl 中，室温放置 5 分钟。
5. 样本洗涤：将载玻片浸入 PBS 中，室温放置 5 分钟。
6. 组织切片固定：将载玻片浸入配制于 PBS 中的 4% 无甲醇的甲醛溶液中，室温放置 15 分钟。

注意：多聚甲醛可直接替代无甲醇的甲醛。

7. 样本洗涤：将载玻片浸入 PBS，室温放置 5 分钟。重复一次，总共用 PBS 洗两次。
8. 去除组织上的液体，并将载玻片放在平坦的表面上。用 PBS 以 1:500 稀释蛋白酶 K 储液（10mg/ml；见第 2 节），配成 20 μ g/ml 的蛋白酶 K 溶液。在每片载玻片上加上 100 μ l 20 μ g/ml 的蛋白酶 K 以覆盖组织切片。室温孵育载玻片 8-10 分钟。

注意：蛋白酶 K 有助于组织和细胞通透从而使后续步骤中的染色试剂更易进入细胞。为了得到最佳的结果，需要优化蛋白酶 K 孵育的时间。厚度超过 4–6 μ m 的组织切片可能需要更长时间的孵育；然而，蛋白酶 K 孵育时间的延长，会增加组织切片在后续洗涤步骤中从载玻片上脱落的风险。

9. 样本洗涤：将载玻片浸入装有 PBS 的染色缸中，室温放置 5 分钟。
10. 组织切片洗涤后固定：将载玻片浸入配制于 PBS 中的 4% 无甲醇的甲醛溶液中，室温放置 5 分钟。
11. 样本洗涤：将载玻片浸入 PBS 中，室温放置 5 分钟。

注意：可在第 11 步通过用 DNA 酶 I 处理样本引起 DNA 断裂来制备选做的**阳性对照**载玻片。第 4.E 节中给出了 DNA 酶处理的流程。

12. 遵循 4.A 中的第 5–16 步来分析这些预处理的组织切片中的细胞凋亡。

注意：强烈推荐使用共聚焦显微镜分析组织切片。

4.C. 用流式细胞术检测悬浮细胞的步骤

1. 将 $3-5 \times 10^6$ 个细胞用 PBS 在 4°C 离心 ($300 \times g$) 洗两次, 然后重悬在 0.5ml PBS 中。
2. 固定细胞: 加入 5ml 配制于 PBS 中的 1% 无甲醇的甲醛溶液, 冰上放置 20 分钟。
注意: 多聚甲醛可直接替代无甲醇的甲醛。
3. 在 4°C 以 $300 \times g$ 离心细胞 10 分钟, 去上清并且重悬于 5ml PBS 中。重复洗一次, 并把细胞重悬在 0.5ml PBS 中。
4. 加入 5ml 冰冷的 70% 乙醇, 使细胞通透。在 -20°C 孵育 4 小时。细胞可在 70% 乙醇中 -20°C 下保存一周。
或者, 细胞可用配制于 PBS 中的 0.2% Triton[®] X-100 溶液通透, 室温放置 5 分钟。
5. 以 $300 \times g$ 离心细胞 10 分钟并且重悬于 5ml PBS。重复离心并把细胞重悬在 1ml PBS 中。
6. 转移 2×10^6 个细胞至一个 1.5ml 的微量离心管。
7. $300 \times g$ 离心 10 分钟, 去上清并把沉淀重悬在 80 μl Equilibration Buffer (平衡缓冲液) 中。室温孵育 5 分钟。
8. 在平衡细胞的同时, 在冰上融化 Nucleotide Mix (核苷混合物), 并且依照表 2, 准备足够量的用于所有反应的 rTdT 孵育缓冲液。对于 2×10^6 个细胞的一个标准反应, 所需体积是 50 μl , 用 50 μl 乘以反应数目来确定所需 rTdT 孵育缓冲液的总体积。

注意: 将 Nucleotide Mix 和 rTdT 孵育缓冲液置于冰上, 避光。

表 2. 制备用于实验反应的 rTdT 孵育缓冲液

缓冲液成分	每 50 μl 标准反应中各成分的体积		反应数目 (实验反应 + 可选阳性对照)		成分体积
Equilibration Buffer	45 μl	x	_____	=	_____ μl
Nucleotide Mix	5 μl	x	_____	=	_____ μl
rTdT 酶	1 μl	x	_____	=	_____ μl
rTdT 孵育缓冲液总体积				=	_____ μl

阴性对照: 按以下方法准备一份不含 rTdT 酶的对照孵育缓冲液: 混合 45 μl Equilibration Buffer、5 μl Nucleotide Mix 和 1 μl 高压灭菌的去离子水。(阴性对照孵育缓冲液的最终体积足够一份标准的 50 μl 反应。) 按照第 9—14 步进行阴性对照反应。

9. 以 $300 \times g$ 离心细胞 10 分钟, 去除上清并把沉淀重悬在 50 μl rTdT 孵育缓冲液中。 37°C 水浴孵育 60 分钟, 避免光照。
每隔 15 分钟用微量移液器重悬细胞。

! 在第 9 步完成之后避免载玻片暴露于光线下。

10. 加入 1ml 20mM EDTA 终止反应。轻柔涡旋混匀。
11. 以 $300 \times g$ 离心 10 分钟, 去上清并把沉淀重悬在 1ml 含 5mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA) 的 0.1% Triton[®] X-100 溶液 (用 PBS 配制) 中。重复一次, 总共漂洗两次。
12. 以 $300 \times g$ 离心 10 分钟, 去除上清并把细胞沉淀重悬在 0.5ml 碘化丙啶溶液中 (用 PBS 新鲜稀释至 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 其中包含 250 μg 无 DNA 酶的 RNA 酶 A。
13. 在黑暗中于室温下孵育细胞 30 分钟。
14. 用流式细胞仪分析细胞。在 $520 \pm 20\text{nm}$ 处检测荧光素 -12-dUTP 的绿色荧光, 在 $>620\text{nm}$ 处检测碘化丙啶的红色荧光。

注意: 碘化丙啶将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色。而荧光素 -12-dUTP 掺入只在凋亡的细胞核内产生局部的绿色荧光。

4.D. 荧光显微镜检测悬浮细胞的步骤

在合适的培养基中培养悬浮细胞。接下来进行对照或者实验处理以诱导凋亡后，将细胞在 4°C 以 300 × g 离心 10 分钟，去除培养基，注意避免吸出细胞。用上述离心的方法在 PBS 中洗细胞，然后以大约 2 × 10⁷ 个细胞/ml 的浓度将细胞重悬在 PBS 中。吸取 50–100 μl 细胞悬液滴在多聚赖氨酸包被或者硅烷化处理的显微镜载玻片上。用一片干净的玻片轻柔地涂开细胞悬液。如 4.A 节所述分析凋亡细胞。还可以用悬浮细胞制备细胞离心涂片，并按 4.A 节所述进行分析。

4.E. DNA 酶处理的阳性对照的步骤（可选）

检测 DNA 断裂的**阳性对照**可用贴壁细胞或组织切片如下所述进行。对于贴壁细胞，按照 4.A 节第 1–4 步所述进行操作。在第 4 步之后，如下所述用 DNA 酶 I 处理细胞来准备阳性对照载玻片。对于石蜡包埋组织，按照 4.B 节第 1–11 步所述进行操作，然后在第 11 步之后准备阳性对照载玻片。

注意：DNA 酶 I 处理固定的细胞会引起染色体 DNA 的断裂，产生许多可标记的 DNA 3'- 羟基末端。下面叙述的流程通常会使得大部分被处理细胞显现绿色荧光。

1. 将 100 μl DNA 酶 I 缓冲液（第 7 节）加到固定的细胞上，室温孵育 5 分钟。
2. 轻轻叩掉液体，加入 100 μl 含 5.5–10 units/ml DNA 酶 I 的缓冲液（目录号 M6101, RQ1 DNase; 当使用其它 DNA 酶时，可能需要优化），室温孵育 10 分钟。
3. 轻叩载玻片去掉多余的液体，然后在专门用于阳性对照的染色缸中用去离子水彻底洗涤载玻片 3–4 次。
4. 如 4.A 节第 5–16 步所述处理阳性对照，使用单独的染色缸。

注意：阳性对照载玻片必须使用**单独的**染色缸。否则，来自阳性对照载玻片上残余的 DNA 酶 I 活性可能会在实验载玻片上引入高的背景。

生物学阳性对照：可以通过多种方法诱导实验样本的凋亡。

- 用蛋白合成抑制剂茴香霉素（anisomycin）或者 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂喜树碱（camptothecin）处理细胞，在人早幼粒细胞系 HL-60 中诱导凋亡（18–21; 参见第 5 节）。
- 撤除生长因子会导致依赖生长因子的细胞系凋亡。例如，NGF 缺乏会诱导 PC12 细胞或培养的交感神经元凋亡（22）。
- 用糖皮质激素、地塞米松体外处理会诱导小鼠胸腺淋巴细胞的凋亡（16, 23）。
- 带有 Fas 或者 TNF- 受体的细胞被各自的配体激活或者与激动剂抗体交联激活会诱导这些细胞的凋亡（24）。

5. 操作实例：喜树碱（Camptothecin）或茴香霉素（Anisomycin）诱导的 HL-60 细胞凋亡分析

1. 在含 10% 胎牛血清、2mM 谷氨酰胺、1% 青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养基中，于 37°C 湿润的 5% CO₂ 培养箱中培养 HL-60 细胞。
2. 将细胞密度调至 6×10^5 个细胞 /ml。喜树碱处理的终浓度为 0.2 μ g/ml（储液溶解在 DMSO 中），在 37°C 湿润的 5% CO₂ 培养箱中孵育 5 小时。茴香霉素处理的终浓度为 2 μ g/ml（储液溶解在 DMSO 中），在 37°C 湿润的 5% CO₂ 培养箱中孵育 2 小时。阴性对照细胞用等体积无抑制剂的 DMSO 处理，并且在相同的条件下孵育。
3. 收集细胞，遵循 4.C 节中第 1–14 步所述进行操作并用流式细胞仪来分析悬液中的细胞凋亡。

图 2 和 3 显示用对照和喜树碱处理过的细胞产生的数据。

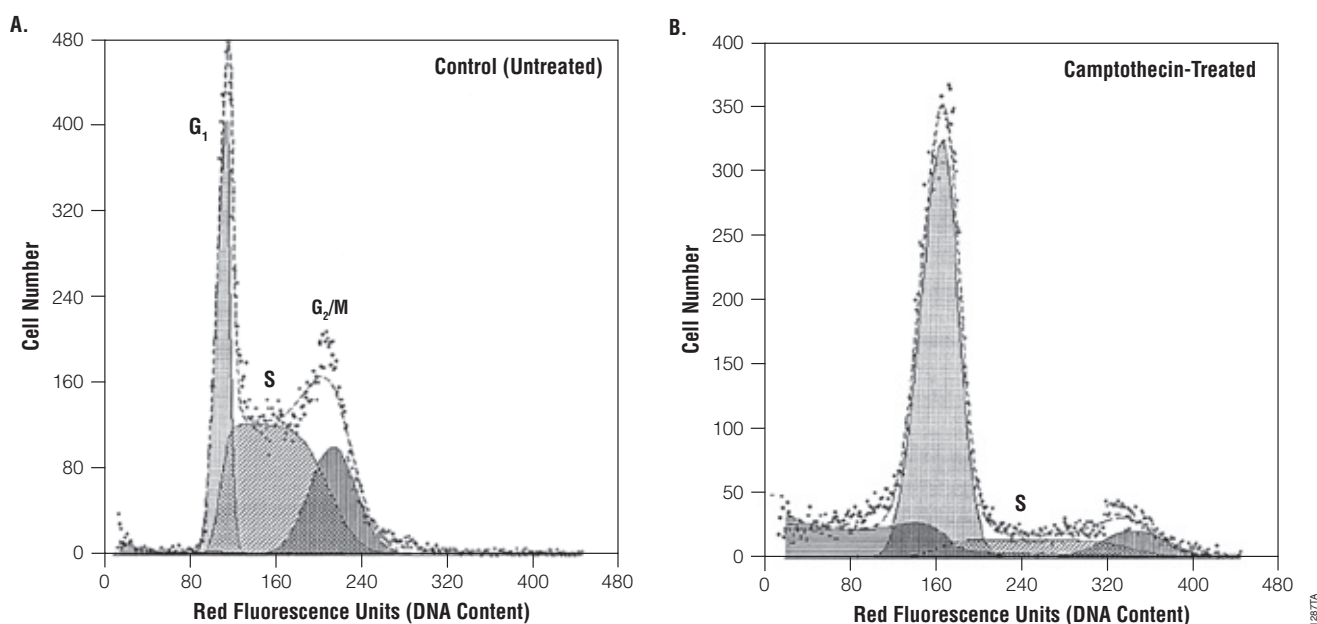


图 2. 流式细胞术分析喜树碱（Camptothecin）诱导的 HL-60 细胞的凋亡。 HL-60 细胞在有或无喜树碱存在的条件下培养，如 4.C 节所述将 DNA 断裂进行标记，用流式细胞仪（EPICS[®] Profile II, Beckman Coulter, Inc）分析悬液中的细胞凋亡情况。对照（未处理的）HL-60 细胞（A 图）和喜树碱处理的 HL-60 细胞（B 图）的 DNA 频率分布直方图如上所示。用 MultiCycle 软件（Phoenix Flow System）进行了细胞周期分析；用 Elite™ 软件（Beckman Coulter, Inc.）进行了 DNA 含量分析。

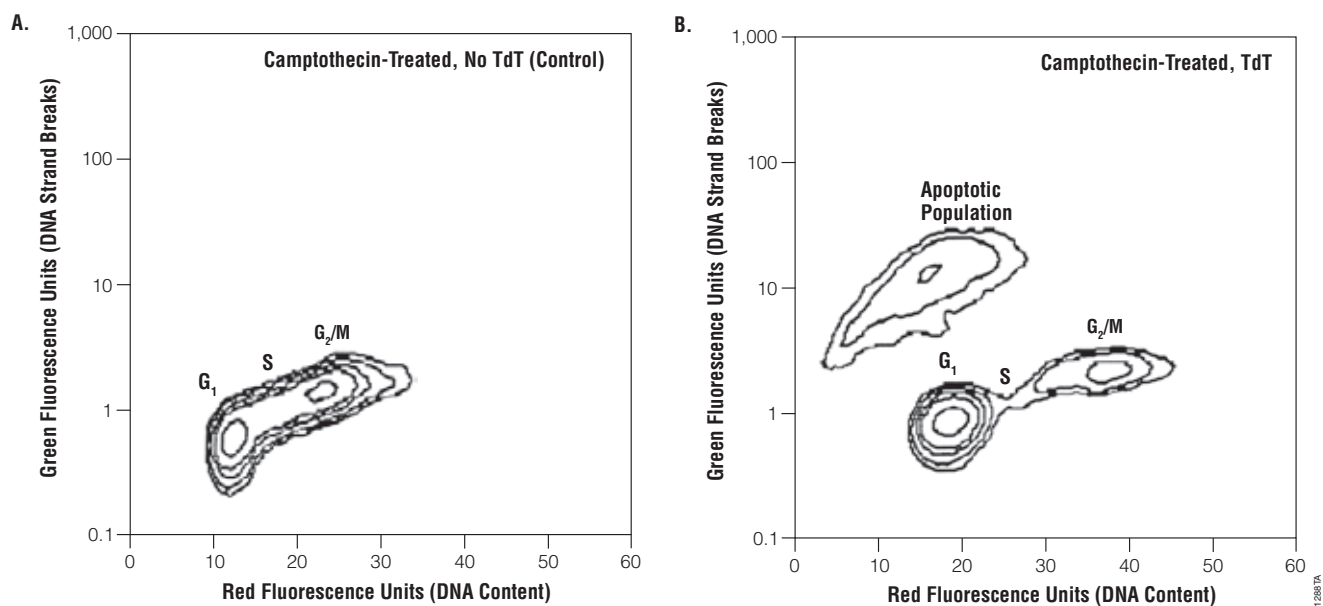


图 3. 在 TdT 酶存在 (B 图) 或不存在 (A 图) 的条件下检测喜树碱 (Camptothecin) 诱导的 HL-60 细胞的凋亡。流式细胞术分析如图 2 所述进行。用 Elite™ 软件 (Beckman Coulter, Inc.) 对 DNA 链断裂进行了分析。

6. 疑难解答

如果您遇到的问题在此没有列出，请联系普洛麦格（北京）生物技术有限公司或当地经销商。联系信息见：www.promega.com。电子邮箱：chinatechserv@promega.com

问题	原因和评论
背景高（即，非凋亡细胞呈现很强的绿色荧光背景染色）	<p>荧光素-12-dUTP 的非特异性掺入。不要让细胞在 4.A 节第 8 步或以后的步骤干掉。</p> <p>在 4.A 节第 10 步，可用含 0.1% Triton® X-100 和 5mg/ml 牛血清白蛋白（BSA）的 PBS 将载玻片洗三次，每次 5 分钟，然后用 PBS 洗一遍。</p>
几乎没有染色或染色不好	<p>蛋白酶 K 或 Triton® X-100 的通透不充分。通过优化通透剂的孵育时间来优化通透步骤。</p>
组织切片从载玻片上脱落	<p>在组织切片粘附之前载玻片的包被不充分。根据参考文献 17 所述步骤展片之前，用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷（3-aminopropyl triethoxysilane, TESPA; Sigma 目录号 A3648）包被显微镜载玻片。TESPA 在防止组织从玻璃上脱落方面比多聚赖氨酸（poly-L-lysine）更为出色。</p> <p>组织切片从载玻片上被酶消化下来。优化 4.B 节中第 8 步的蛋白酶 K 孵育时间。</p>
用显微镜或流式细胞仪进行最后分析时只剩下很少的细胞	<p>在操作过程中丢失了大量细胞：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 提高起始细胞数。 • 在 4.D 节中，当制备贴到显微镜载玻片的细胞悬液时，离心过程中可用含 1% BSA 的 PBS 洗细胞。 • 如果有条件的话，可使用细胞离心涂片机（cytospin centrifuge）使细胞粘附到显微镜载玻片上。 • 在 4.C 节第 1 步中制备悬浮细胞时，离心过程中可用含 1% BSA 的 PBS 洗细胞。

7. 缓冲液和溶液的成分

Equilibration Buffer (平衡缓冲液)

200mM potassium cacodylate (二甲胍酸钾)
(pH 6.6, 25°C)
25mM Tris-HCl
(pH 6.6, 25°C)
0.2mM DTT
0.25mg/ml BSA
2.5mM cobalt chloride (氯化钴)

蛋白酶 K 缓冲液

100mM Tris-HCl (pH 8.0)
50mM EDTA

Nucleotide Mix (核苷混合物)

50μM fluorescein -12-dUTP (荧光素 -12-dUTP)
100μM dATP
10mM Tris-HCl (pH 7.6)
1mM EDTA

碘化丙啶溶液

(1mg/ml)

称取 10mg 碘化丙啶并溶于 10ml PBS 中。在 0–4°C 避光储存该溶液。使用时适量稀释。

20X SSC

87.7g NaCl
44.1g sodium citrate (柠檬酸钠)
溶于 400ml 去离子水中。用盐酸 (HCl) 调 pH 值至 7.0 后, 加水定容至 500ml。

2X SSC

将 20X SSC 平衡至室温以保证其中所有的盐都是溶解的。使用前用去离子水 1:10 稀释得到 2X SSC。

DNA 酶 I (DNase I) 缓冲液

40mM Tris-HCl (pH 7.9)
10mM NaCl
6mM MgCl₂
10mM CaCl₂

1X PBS (pH 7.4)

137mM NaCl
2.68mM KCl
1.47mM KH₂PO₄
8.1mM Na₂HPO₄

rTdT 孵育缓冲液

混合下面的溶液:

90μl Equilibration Buffer

10μl Nucleotide Mix

2μl rTdT 酶

这个量足够做两个反应。在冰上解冻组分。在使用前即刻准备混合物, 并且注意避光放置于冰上直到准备使用。

1% 甲醛溶液

将 6.25ml 16% 无甲醇的甲醛与 90ml PBS 混合。加几滴 1N 氢氧化钠 (NaOH), 混匀并调节 pH 值至 7.4。用 PBS 定容至 100ml。每次使用前新鲜配制。

4% 甲醛溶液

将 25ml 16% 无甲醇的甲醛与 90ml PBS 混合。加几滴 1N 氢氧化钠 (NaOH), 混匀并调节 pH 值至 7.4。用 PBS 定容至 100ml。每次使用前新鲜配制。

4% 多聚甲醛溶液

在通风橱中称取 4g 多聚甲醛, 加 PBS 至 100ml。装于密闭容器中在 65°C 水浴加热溶解 2 小时。4°C 储存该溶液, 至少两周是稳定的。

10% Triton® X-100 溶液

在烧杯中将 85ml 高压灭菌去离子水和 10ml Triton® X-100 溶液混合, 放置于磁力搅拌器上用磁力搅拌子混匀。用水定容至 100ml。

8. 相关产品

产品	规格	目录号
Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb	50µl	G7481
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (fluorescent)	10ml	G7790
	100ml	G7791
Caspase-Glo® 2 Assay*	10ml	G0940
	50ml	G0941
Caspase-Glo® 6 Assay*	10ml	G0970
	50ml	G0971
Caspase-Glo® 3/7 Assay* (luminescent)	2.5ml	G8090
	10ml	G8091
	100ml	G8092
Caspase-Glo® 8 Assay* (luminescent)	2.5ml	G8200
	10ml	G8201
	100ml	G8202
Caspase-Glo® 9 Assay* (luminescent)	2.5ml	G8210
	10ml	G8211
	100ml	G8212
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System*	20 reactions	G7360
	40 reactions	G7130
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	50µl	G7461
	125µl	G7462
Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK	50µl	G7231
	125µl	G7232
Caspase Inhibitor Ac-DEVD-CHO	100µl	G5961
Anti-PARP p85 Fragment pAb	50µl	G7341
rhTNF- α	10µg	G5241
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant*	300u	M1871
RQ1 RNase-Free DNase*	1,000u	M6101
MultiTox-Fluor™ Multiplex Cytotoxicity Assay* (fluorometric, nonlytic live/dead assay)	10ml	G9200
	5 × 10ml	G9201
MultiTox-Fluor™ Multiplex Cytotoxicity Assay* (fluorometric, nonlytic live/dead assay)	10ml	G9270
	5 × 10ml	G9271

* 供实验室使用。也提供其它规格的产品。

产品	规格	目录号
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay* (fluorometric)	10ml	G9260
	5 × 10ml	G9261
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay* (luminescent)	10ml	G9290
	5 × 10ml	G9291
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (ATP, luminescent)	10ml	G7570
	10 × 10ml	G7571
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay* (fluorometric)	10ml	G6080
	5 × 10ml	G6081
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (resazurin, fluorometric)	20ml	G8080
	100ml	G8081
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (LDH, fluorometric)	200–400 assays	G7890
	1,000–4,000 assays	G7891
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS, colorimetric)	200 assays	G3582
	1,000 assays	G3580
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTS, colorimetric)	1,000 assays	G5421
	5,000 assays	G5430
CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder*	250mg	G1112
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTT, colorimetric)	1,000 assays	G4000
	5,000 assays	G4100
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (LDH, colorimetric)	1,000 assays	G1780

* 供实验室使用。也提供其它规格的产品。

9. 参考文献

1. Kerr, J.F.R. *et al.* (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–57.
2. Wyllie, A.H. *et al.* (1980) Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251–306.
3. Ellis, R.E. *et al.* (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**, 663–98.
4. Raff, M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**, 397–400.
5. Martin, S.J. *et al.* (1994) Dicing with death: Dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 26–30.
6. Cohen, J.J. *et al.* (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 267–93.
7. Nagata, S. (1994) Fas and Fas ligand: A death factor and its receptor. *Adv. Immunol.* **57**, 129–44.
8. Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456–62.
9. Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445–49.
10. Oltvai, Z. and Korsmeyer, S.J. (1994) Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* **79**, 189–92.
11. Schwartzman, R.A. and Cidlowski, J.A. (1993) Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev.* **14**, 133–51.
12. Walker, P.R. *et al.* (1991) Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.* **51**, 1078–85.
13. Oberhammer, F. *et al.* (1993) Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* **12**, 3679–84.
14. Roy, C. *et al.* (1992) The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp. Cell Res.* **200**, 416–24.
15. Bortner, C.D. *et al.* (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* **5**, 21–6.
16. Gavrieli, Y. *et al.* (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* **119**, 493–501.
17. Ben-Sasson, S.A. *et al.* (1995) Identification of dying cells—in situ staining. *Methods Cell Biol.* **46**, 29–39.
18. Del Bino, G. *et al.* (1991) The concentration-dependent diversity of effects of DNA topoisomerase I and II inhibitors on the cell cycle of HL-60 cells. *Exp. Cell Res.* **195**, 485–91.
19. Li, X. *et al.* (1995) Single-step procedure for labeling DNA strand breaks with fluorescein- or BODIPY-conjugated deoxynucleotides: Detection of apoptosis and bromodeoxyuridine incorporation. *Cytometry* **20**, 172–80.
20. Gorczyca, W. *et al.* (1993) The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* **53**, 3186–92.
21. Darzynkiewicz, Z. *et al.* (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* **13**, 795–808.

22. Batistatou, A. and Greene, L.A. (1991) Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: Correlation with suppression of endonuclease activity. *J. Cell Biol.* **115**, 461–71.
23. Cohen, J.J. and Duke, R.C. (1984) Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* **132**, 38–42.
24. Tewari, M. and Dixit, V.M. (1995) Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* **270**, 3255–60.

(a) For Research Use Only

This product is distributed and sold under an arrangement between ENZO DIAGNOSTICS, INC., and NEN? LIFE SCIENCE PRODUCTS, INC., for research purposes only by the end-user in the research market and is not intended for diagnostic or therapeutic use. Purchase does not include or carry any right or license to use, develop or otherwise exploit this product commercially. Any commercial use, development or exploitation of this product without the express prior written authorization of ENZO DIAGNOSTICS, INC., and NEN? LIFE SCIENCE PRODUCTS, INC., is strictly prohibited.

This product or use of this product may be covered by one or more ENZO patents, including the following: U.S. Pat. Nos.

4,952,685, 5,002,885 and 5,013,831 and DK 164 407 8 and by one or more NEN? patents including U.S. Pat. Nos. 5,047,519, 5,151,507 and 5,608,063. . 1996, 1999, 2001, 2003, 2006, 2007, 2008, 2009 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Anti-ACTIVE, Apo-ONE, Caspase-Glo, CellTiter 96, CellTiter-Blue, CellTiter-Glo and CytoTox 96 registered trademarks of Promega Corporation. CaspACE, CellTiter-Fluor, CytoTox-Fluor, CytoTox-Glo, CytoTox-ONE, DeadEnd and MultiTox-Fluor are trademarks of Promega Corporation.

Elite is a trademark of and EPICS is a registered trademark of Beckman Coulter, Inc. Lab-Tek is a registered trademark of Nalge Nunc International. NEN is a registered trademark of NEN Life Science Products, Inc. Poly-Prep is a registered trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. SlowFade is a registered trademark of Molecular Probes, Inc. Superfrost is a registered trademark of Erie Scientific. Triton is a registered trademark of Union Carbide Chemicals & Plastics Technology Corporation. VECTASHIELD is a registered trademark of Vector Laboratories, Inc.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.