

# TUNEL 法检测细胞凋亡实验原理和方法

细胞凋亡中染色体 DNA 的断裂是个渐进的分阶段的过程，染色体 DNA 首先在内源性的核酸水解酶的作用下降解为 50-300kb 的大片段。然后大约 30 % 的染色体 DNA 在  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  依赖的核酸内切酶作用下，在核小体单位之间被随机切断，形成 180 ~ 200bp 核小体 DNA 多聚体。

DNA 双链断裂或只要一条链上出现缺口而产生的一系列 DNA 的 3' -OH 末端可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的作用下，将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸化酶或生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3' -末端，从而可进行凋亡细胞的检测，这类方法一般称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (TUNEL)。

由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂，因而没有 3' -OH 形成，很少能够被染色。低分子量的 DNA 分离后，也可使用 DNA 聚合酶进行缺口翻译 (nick translation)，使低分子量的 DNA 标记或染色，然后分析凋亡细胞。

TUNEL 或缺口翻译法实际上是分子生物学与形态学相结合的研究方法，对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色，能准确的反应细胞凋亡最典型的生物化学和形态特征，可用于石蜡包埋组织切片、冰冻组织切片、培养的细胞和从组织中分离的细胞的细胞凋亡测定，并可检测出极少量的凋亡细胞，灵敏度远比一般的组织化学和生物化学测定法要高，因而在细胞凋亡的研究中已被广泛采用。

## 一、过氧化物酶标记测定法

**原理：**脱氧核糖核苷酸衍生物地高辛 [ (digoxigenin) -11-dUTP] 在 TdT 酶的作用下，可以掺入到凋亡细胞双链或单链 DNA 的 3-OH 末端，与 dATP 形成异多聚体，并可与连接了报告酶（过氧化物酶或碱性磷酸酶）的抗地高辛抗体结合。在适合底物存在下，过氧化物酶可产生很强的颜色反应，特异准确的定位出正在凋亡的细胞，因而可在普通光学显微镜下进

行观察。

毛地黄植物是地高辛的唯一来源。在所有动物组织中几乎不存在能与抗地高辛抗体结合的配体，因而非特异性反应很低。抗地高辛的特异性抗体与脊椎动物甾体激素的交叉反应不到1%，若此抗体的 Fc 部分通过蛋白酶水解的方法除去后，则可完全排除细胞 Fc 受体非特异性的吸附作用。

本方法可以用于福尔马林固定的石蜡包埋的组织切片、冰冻切片和培养的或从组织中分离的细胞凋亡测定。

### **(一)试剂配制**

- 1、磷酸缓冲液 PBS (pH7.4)：磷酸钠盐 50mM，NaCl 200mM。
- 2、蛋白酶 K (200 $\mu$ g/ml, pH7.4)：蛋白酶 K 0.02g；PBS 100ml。
- 3、含 2%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 PBS 缓冲液 (pH7.4)：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.0ml；PBS 缓冲液 98.0ml。
- 4、TdT 酶缓冲液 (新鲜配)：Trizma 碱 3.63g 用 0.1N HCl 调节 pH 至 7.2，加 ddH<sub>2</sub>O 定容到 1000ml；再加入二甲砷酸钠 29.96g 和氯化钴 0.238g。
- 5、TdT 酶反应液：TdT 酶 32 $\mu$ l；TdT 酶缓冲液 76 $\mu$ l，混匀，置于冰上备用。
- 6、洗涤与终止反应缓冲液：氯化钠 17.4g；柠檬酸钠 8.82g；ddH<sub>2</sub>O 1000ml
- 7、0.05%二氨基联苯 (DAB) 溶液：DAB 5mg；PBS 10ml, pH7.4, 临用前过滤后，加过氧化氢至 0.02%。
- 8、0.5%甲基绿 (pH4.0)：甲基绿 0.5g；0.1M 乙酸钠 100ml。
- 9、100%丁醇，100%、95%、90%、80%和 70%乙醇，二甲苯，10%中性甲醛溶液，乙酸，松香水等。
- 10、过氧化物酶标记的抗地高辛抗体 (ONCOR)

## (二) 实验步骤

### 1、标本预处理：

(1) 石蜡包埋的组织切片预处理：将组织切片置于染色缸中，用二甲苯洗两次，每次 5min。用无水乙醇洗两次，每次 3min。用 95% 和 75% 乙醇各洗一次，每次 3min。用 PBS 洗 5min 加入蛋白酶 K 溶液 (20ug / ml)，于室温水解 15min，去除组织蛋白。用蒸馏水洗 4 次，每次 2min，然后按下述步骤 2 进行操作。

(2) 冰冻组织切片预处理：将冰冻组织切片置 10% 中性甲醛中，于室温固定 10min 后，去除多余液体。用 PBS 洗两次，每次 5min。置乙醇：乙酸 (2：1) 的溶液中，于 -20℃ 处理 5min，去除多余液体。用 PBS 洗两次，每次 5min，然后按下述步骤 2 进行操作。

(3) 培养的或从组织分离的细胞的预处理：将约  $5 \times 10^7$  个/ml 细胞于 4% 中性甲醛室温中固定 10min。在载玻片上滴加 50 ~ 100 $\mu$ l 细胞悬液并使之干燥。用 PBS 洗两次，每次 5min，然后按下述步骤 2 进行操作。

2、色缸中加入含 2% 过氧化氢的 PBS，于室温反应 5min。用 PBS 洗两次，每次 5min。

3、用滤纸小心吸去载玻片上组织周围的多余液体，立即在切片上加 2 滴 TdT 酶缓冲液，置室温 1 ~ 5min。

4、用滤纸小心吸去切片周围的多余液体，立即在切片上滴加 54 $\mu$ l TdT 酶反应液，置湿盒中于 37℃ 反应 1hr (注意：阴性染色对照，加不含 TdT 酶的反应液)。

5、将切片置于染色缸中，加入已预热到 37℃ 的洗涤与终止反应缓冲液，于 37℃ 保温 30min，每 10min 将载玻片轻轻提起和放下一一次，使液体轻微搅动。

6、组织切片用 PBS 洗 3 次，每次 5min 后，直接在切片上滴加两滴过氧化物酶标记的抗地高辛抗体，于湿盒中室温反应 30min。

7、用 PBS 洗 4 次，每次 5min。

- 8、在组织切片上直接滴加新鲜配制的 0.05%DAB 溶液，室温显色 3 ~ 6min。
- 9、用蒸馏水洗 4 次，前 3 次每次 1min，最后 1 次 5min。
- 10、于室温用甲基绿进行复染 10min。用蒸馏水洗 3 次，前两次将载玻片提起放下 10 次，最后 1 次静置 30s。依同样方法再用 100%正丁醇洗三次。
- 11、用二甲苯脱水 3 次，每次 2min，封片、干燥后，在光学显微镜下观察并记录实验结果。

### **(三) 注意事项**

一定要设立阳性和阴性细胞对照。阳性对照的切片可使用 DNaseI 部分降解的标本，阳性细胞对照可使用地塞米松 (1 $\mu$ M) 处理 3-4hr 的大、小鼠胸腺细胞或人外周血淋巴细胞。阴性对照不加 TdT 酶，其余步骤与实验组相同。