

细胞凋亡检测，细胞凋亡实验步骤，检测方法

一、定性和定量研究

只定性的研究方法：常规琼脂糖凝胶电泳、脉冲场倒转琼脂糖凝胶电泳、形态学观察（普通光学显微镜、透射电镜、荧光显微镜）

进行定量或半定量的研究方法：各种流式细胞仪方法、原位末端标记法、ELISA 定量琼脂糖凝胶电泳。

二、区分凋亡和坏死

可将二者区分开的方法：琼脂糖凝胶电泳，形态学观察（透射电镜是区分凋亡和坏死最可靠的方法），Hoechst33342/PI 双染色法流式细胞仪检测，AnnexinV/PI 双染色法流式细胞仪检测等。

不能将二者区分开的方法：原位末端标记法、PI 单染色法流式细胞仪检测等。

三、样品来源不同选择

组织：主要用形态学方法(HE 染色，透射电镜、石蜡包埋组织切片进行原位末端标记，ELISA 或将组织碾碎消化做琼脂糖凝胶电泳)。

四、细胞凋亡检测

1、早期检测:

1) PS(磷脂酰丝氨酸)在细胞外膜上的检测

2)细胞内氧化还原状态改变的检测

3)细胞色素 C 的定位检测

4) 线粒体膜电位变化的检测

2、 晚期检测：

细胞凋亡晚期中，核酸内切酶在核小体之间剪切核 DNA，产生大量长度在 180-200 bp 的 DNA 片段。

对于晚期检测通常有以下方法：

1) TUNEL(末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记)

2) LM-PCR Ladder (连接介导的 PCR 检测)

3) Telemerase Detection (端粒酶检测)

3、 生化检测：

1) 典型的生化特征：DNA 片段化

2) 检测方法主要有：琼脂糖凝胶电泳、原位末端标记（TUNEL）等

3) TUNEL（末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记）

4) 通过 DNA 末端转移酶将带标记的 dNTP（多为 dUTP）间接或直接接到 DNA 片段的 3'-OH 端，再通过酶联显色或荧光检测定量分析结果。可做细胞悬液、福尔马林固定或石蜡处理的组织、细胞培养物等多种样本的检测。

4、 LM-PCR Ladder (连接介导的 PCR 检测)

当凋亡细胞比例较小以及检测样品量很少（如活体组织切片）时，直接琼脂糖电泳可能观察不到核 DNA 的变化。通过 LM-PCR,连上特异性接头，专一性地扩增梯度片段，从而灵敏地检测凋亡时产生梯度片段。此外，LM-PCR 检测是半定量的，因此相同凋亡程度的不同样品可进行比较。如果细胞量很少，还可在分离提纯 DNA 后，用 ^{32}P -ATP 和脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT）使 DNA 标记，然后进行电泳和放射自显影，观察凋亡细胞中 DNA

ladder 的形成。

上述两种方法都针对细胞凋亡晚期核 DNA 断裂这一特征，但细胞受到其它损伤（如机械损伤，紫外线等）也会产生这一现象，因此它对细胞凋亡的检测会受到其它原因的干扰。需结合其它的方法来检测细胞凋亡。

其它方法：

1) Telomerase Detection (端粒酶检测)

端粒酶是由 RNA 和蛋白组成，它可以自身 RNA 为模板逆转录合成端粒区重复序列，使细胞获得“永生性”。正常体细胞是没有端粒酶活性的，每分裂一次，染色体的端粒会缩短，这可能作为有丝分裂的一种时钟，表明细胞年龄、复制衰老或细胞凋亡的信号。研究发现，90%以上的癌细胞或凋亡细胞都具有端粒酶的活性。

2) mRNA 水平的检测

研究者们发现了很多在细胞凋亡时表达异常的基因，检测这些特异基因的表达水平也成为检测细胞凋亡的一种常用方法。据报道，Fas 蛋白结合受体后能诱导癌细胞中的细胞毒性 T 细胞（cytotoxic T cells）等靶细胞。Bcl-2 和 bcl-X (长的) 作为抗凋亡（bcl-2 和 bcl-X）的调节物，它们的表达水平比例决定了细胞是凋亡还是存活。用荧光定量 PCR 技术来检测基因表达水平无疑比之前者更快更准确。通过检测 fas, bax-alpha 和 bcl-X (长的) 基因的 mRNA 表达水平来进行细胞凋亡的检测。

5、细胞内氧化还原状态改变的检测：

正常状态下，谷胱甘肽(GSH)作为细胞的一种重要的氧化还原缓冲剂。细胞内有毒的氧化物通过被 GSH 还原而定期去除，氧化型的 GSH 又可被 GSH 还原酶迅速还原。这一反应在线粒体中尤为重要，许多呼吸作用中副产物的氧化损伤将由此被去除。当细胞内 GSH 的排除非常活跃时，细胞液就由还原环境转为氧化环境，这可能导致了凋亡早期细胞线粒体膜电位的

降低,从而使细胞色素 C (三羧酸循环中的重要组分)从线粒体内转移到细胞液中,启动凋亡效应器 caspase 的级联反应。

6、细胞色素 C 的定位检测

细胞色素 C 作为一种信号物质,在细胞凋亡中发挥着重要的作用。正常情况下,它存在于线粒体内膜和外膜之间的腔中,凋亡信号刺激使其从线粒体释放至细胞浆,结合 Apaf-1

(apoptotic protease activating factor-1)后启动 caspase 级联反应:细胞色素 C/Apaf-1 复合物激活 caspase-9,后者再激活 caspase-3 和其它下游 caspase。

7、线粒体膜电位变化的检测:

1) 线粒体跨膜电位的耗散与细胞凋亡有密切关系

2) 近年来陆续有报道说明线粒体跨膜电位的耗散早于核酸酶的激活,也早于磷脂酰丝氨酸暴露于细胞表面。而一旦线粒体跨膜电位耗散,细胞就会进入不可逆的凋亡过程。

3) 在细胞凋亡过程中线粒体跨膜电位的耗散主要是由于线粒体内膜的通透性转变,这是由于生成了动态的由多个蛋白质组成的位于线粒体内膜与外膜接触位点的通透性转变孔道(PT 孔道)能稳定线粒体跨膜电位就能防止细胞凋亡。

线粒体在细胞凋亡作用中的进一步证据:

1) 若将纯化的正常的线粒体与纯化的细胞核在一起保温,并不导致细胞核的变化。但若将诱导生成 PT 孔道的线粒体与纯化的细胞核一同保温,细胞核即开始凋亡变化。

2) 形态学观察,看到细胞数目有限,统计学上的准确性受影响;

3) 凝胶电泳检测 DNA 破坏了细胞的完整性也不能测出凋亡细胞占总细胞的比例;

4) 流式细胞术可检测细胞、亚细胞及分子水平的特征性变化。

用于流式细胞仪检测的染料:

PI、Hoechst、EB、DAPI、丫啶橙等,其中 PI、Hoechst 最常用。

PI 和 Hoechst33342 双标:

PI、Hoechst33342 均可与细胞核 DNA (或 RNA) 结合。但是 PI 不能通过正常的细胞膜, Hoechst 则为膜通透性的荧光染料, 故细胞在处于坏死或晚期凋亡时细胞膜被破坏, 这时可为 PI 着红色。正常细胞和中早期凋亡细胞均可被 Hoechst 着色, 但是正常细胞核的 Hoechst 着色的形态呈圆形, 淡兰色, 内有较深的兰色颗粒; 而凋亡细胞的核由于浓集而呈亮兰色, 或核呈分叶, 碎片状, 边集。

故 PI 着色为坏死细胞; 亮兰色, 或核呈分叶状, 边集的 Hoechst 着色的为凋亡细胞。

PI 和 Annexin-V 双标:

磷脂酰丝氨酸 (PS) 正常位于细胞膜的内侧, 但在细胞凋亡的早期 (或细胞损伤时) PS 可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面, 暴露在细胞外环境中。

Annexin-V (green) 可以和磷脂酰丝氨酸 (PS) 特异性结合。因此细胞处于凋亡或坏死时, Annexin-V 可为阳性 (早期的坏死细胞可能为阴性)。但是只有坏死的细胞 PI 是阳性

五、形态学观察

1、普通光学显微镜观察

2、透射电子显微镜观察

3、荧光显微镜观察

1、普通光镜下观察:

1)用苏木素-伊红 (HE) 染色: 细胞核固缩碎裂、呈蓝黑色、胞浆呈淡红色 (凋亡细胞), 正常细胞核呈均匀淡蓝色或蓝色, 坏死细胞核呈很淡的蓝色或蓝色消失

2)Giemsa 染色法、瑞氏染色法等, 正常细胞核的色泽均一, 凋亡细胞染色变深, 坏死细胞染色浅或没染上颜色

直接用倒置显微镜观察：

- 1) 细胞体积变小，全面皱缩；
- 2) 凋亡小体为数个圆形小体围绕在细胞周围。

2、透射电子显微镜观察

凋亡细胞体积变小，细胞质浓缩。

细胞凋亡过程中细胞核染色质的形态学改变分为三期：I 期的细胞核呈波纹状或呈折缝样，部分染色质出现浓缩状态；IIa 期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化；IIb 期的细胞核裂解为碎块，产生凋亡小体。

3、荧光显微镜

常用的荧光染料：丫啶橙、PI、DAPI、Hoechst33258 和 Hoechst33342、EB 等

Hoechst 33342、Hoechst 33258、DAPI 三种染料与 DNA 的结合是非嵌入式的，主要结合在 DNA 的 A-T 碱基区。紫外光激发时发射明亮的蓝色荧光。

1) PI 双染色法基本原理

Hoechst 是与 DNA 特异结合的活性染料，能进入正常细胞膜而对细胞没有太大得细胞毒作用。Hoechst 33342 在凋亡细胞中的荧光强度要比正常细胞中要高。

DAPI 为半通透性，用于常规固定细胞的染色。

碘化丙啶(PI)是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但在凋亡中晚期的细胞和死细胞，PI 能够透过细胞膜而将细胞核染红。因此将 Annexin-V 与 PI 匹配使用，就可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。

注意事项：细胞凋亡时，其 DNA 可染性降低被认为是凋亡细胞的标志之一，但这种 DNA 可染性降低也可能是因为 DNA 含量的降低，或者是因为 DNA 结构的改变使其与染料结合的能力发生改变所致。在分析结果时应该注意。

六、细胞凋亡的分子生物学检测方法:

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 Ca^{2+} 和 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。

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 (200μg/ml, pH7.4): 蛋白酶 K 0.02g; PBS 100ml。
- 3、含 2%H₂O₂ 的 PBS 缓冲液 (pH7.4): H₂O₂ 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 ddH₂O 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 32μl; TdT 酶缓冲液 76μl, 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; ddH₂O 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 5×10^7 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 μ 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 μ 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 μ 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。

一、吖啶橙(简称 AO)荧光染色法

原理：吖啶橙(Acridine Orange)是吖啶的衍生物之一。它是一种荧光染料，激发峰 492nm，荧光发射峰 530nm(DNA)，640nm(RNA)，它与双链 DNA 的结合方式是嵌入双链之间，而与单链 DNA 和 RNA 则由静电吸引堆积在其磷酸根上。在蓝光(给 502nm)激发下，细胞核发亮绿色荧光(约 530nm)，核仁和胞质 RNA 发桔红色荧光(> 580nm)。吖啶橙的阳离子也可以结合在蛋白质、多糖和膜上而发荧光，但细胞固定阻抑了这种结合，从而主要显示 DNA、RNA 两种核酸。

(1)试剂

AO 贮备液：

AO 50mg(分析纯)

蒸馏水 50ml

4℃冰箱保存 4 个月。

Tris 缓冲液：

Tris 50mmol/L

MgCl₂ 2.5mmol/L

KCl 25mmol/L

AO 工作液:

将 AO 贮备液 10:1 用蒸馏水稀释, 再用 Tris 缓冲液将 AO 稀释到 8.5μg/ml 的终浓度。

(2)操作步骤

①取乙醇固定的细胞悬液, 浓度为 10⁷/ml, 1500r/min, 5 分钟, 弃乙醇。

②加入 2ml AO 工作液, 室温染 10 分钟。

③滴在载玻片上, 加缓冲甘油封片。

④在荧光显微镜下用吸收波长 405nm, 发射波长 530-640nm 观察。

结 果: 活细胞核呈黄绿色荧光, 胞质呈红色荧光。凋亡细胞核染色质呈黄绿色浓聚在核膜内侧, 可见细胞膜呈泡状膨出及凋亡小体。

二、Hoechst33258 染色

Hoechst33258 为特异性 DNA 染料,, 与 A-T 键结合, 但在 pH2.0 环境下则优先与 RNA 结合, 染色 DNA 时应调整染液的 pH 至 7.0, 这种染料不溶于磷酸缓冲液; 所以配制时必须先以蒸馏水溶解配成储存液在 4℃中避光保存。

本方法是用于培养细胞、细胞涂片或细胞甩片。

试剂及配制

(1)Hoechst33258 贮存液: 称取 Hoechst33258 试剂 1mg, 用 20ml 蒸馏水溶解后, 滤过, 4℃避光保存。用时蒸馏水 10 倍稀释成染色液。

(2) 0.01molPBS, pH7.2。

(3)封片液(pH5.5): 20mmol/L 柠檬酸, 50mmol/L 磷酸氢二钠, 50%甘油。

(4)细胞固定液：甲醇/冰乙酸(3:1)，现配。

操作方法

(1)原代细胞培养、细胞学涂片或细胞甩片机机制制备的单细胞片。

(2)细胞固定液 4℃固定 5min。

(3)蒸馏水稍洗后，点加 Hoechst33258 染色液，10min。

(4)蒸馏水洗片后，用滤纸沾去多余液体。

(5)封片剂封片后荧光显微镜观察。

结果：在荧光显微镜下，活细胞核呈弥散、均匀荧光，坏死细胞不被 Hoechst 染色。出现细胞凋亡时，细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状蓝色荧光及明显核形态变化，如果见到 3 个或 3 个以上的 DNA 荧光碎片被认为是凋亡细胞。

三、甲基绿-派诺宁染色法

(一)原理

细胞凋亡和细胞坏死均可表现为细胞核固缩等细胞死亡形态，但两者发生机制不同。细胞凋亡是一种细胞主动死亡过程，需要有细胞内蛋白酶的激活，细胞质内常有 mRNA 表达的增强。而细胞坏死是一种被动的细胞死亡过程，细胞质内常有 RNA 的损失。根据这一特点，可应用试剂甲基绿对 DNA 染色的特异性和派诺宁对 RNA 的亲水性，使甲基绿对固缩细胞核内的脱氧核糖核酸着染，如果细胞质内核糖核酸呈派诺宁阳性染色者为凋亡细胞，呈阴性染色者为坏死细胞。

(二)试剂及配制

1. 组织固定液

无水乙醇 600ml

氯仿 300ml

冰醋酸 100ml

2.甲基绿纯化 新购买的甲基绿需用氯仿进行纯化处理以去除甲基紫。方法是 将 2%甲基绿水溶液 20ml 倾入洁净分液漏斗，加入氯仿 20ml 充分，使其内的甲基溶于氯仿中而呈紫红色。旋动分液漏斗下部的砂塞，慢慢把下沉带比红色的氯仿移去，再加入新的氯仿 10ml，如此反复更换氯仿，直到无紫红色为止。该液作为贮存液，4℃保存。

3.染色液

甲基绿贮存液 5ml

5%派诺宁水溶液 1ml

蒸馏水 12ml

0.2mol/L 乙酸钠(pH4.8) 18ml

临用前配制，滤纸过滤。

(三)操作方法

1.新鲜取材组织置固定液中 4℃固定 3-6h(或培养细胞、细胞学甩片固定 10min)。

2.直接转入 95%乙醇脱水和无水乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋。

3.切片经二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化至蒸馏水。(细胞学涂片不用梯度酒精)

4.置染色液中室温下染色约 1h。

5.取出切片，不经水洗，用滤纸吸干多余染液。

6.插入丙酮中迅速分化。

7.转入丙酮二甲苯(1:1)稍洗。

8.二甲苯透明 2-3 次。

9.中性树胶封固。

(四)结果

光学显微镜下调亡细胞固缩，细胞核呈绿色或绿蓝色着染，胞质呈红紫色着染，坏死细胞只有固缩细胞核呈绿色着染。观察时可用凋亡指数进行计数，即随机选择约 10-20 个视野(每张切片约 1000-2500 个细胞)，计数凋亡细胞百分率。

四、TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术(TUNEL)

原理：在机体内部随时都在发生着细胞的死亡。传统上用显微镜来观察细胞的死亡，其特征为核染色质的浓缩及碎片的形成。但是这种现象出现的很晚，时间也很短暂。凋亡的特征是内源性核酸内切酶被激活，细胞自身的染色质或 DNA 被切割，出现单链或双链缺口，并产生与 DNA 断点数目相同的 3'-OH 末端。

末端脱氧核糖核酸转移酶(Terminal deoxynucleotidyl Transferase TdT)可以将地高辛标记的 dUTP(DIG-dUTP)标记至 3'-OH 末端，DIG-dUTP(核苷酸)结合在 DNA 断点部位，可以通过生物标记的抗地高辛抗体(Anti-DIG-Biotin)反应后，再结合链酶亲和素-过氧化物酶(SABC)，然后加入显色底物 DAB 予以显示。凋亡的细胞核呈棕黄色，从而可以在显微镜下观察到着色的凋亡细胞。

试剂

1.标记缓冲液(Labeling Buffer)

5×浓度的 TdT 反应缓冲液，含有以下成分：

500mmol/L 二甲胍酸钾。pH7.2

10mmol/L CoCl₂ (氯化钴)

1mmol/L DTT(二硫苏糖醇)

2.末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT,×20)

3.DIG-dUTP(×20)

4.封闭液(Blocking Reagent)

5.生物素化抗地高辛抗体($\times 100$)

6.SABC($\times 100$)

7.ProteinaseK($\times 200$)

8.抗体稀释液

9. 多聚赖氨酸或 APES。

10. 0.01M TBS,PH7.5(配法: 1L 双蒸馏水中加入 8.5 克氯化钠, 1.2 克 Tris 和 0.45-0.5ml 纯乙酸。)

11. DAB 显色试剂。

操作步骤

1.样品处理

(1)玻片预先用多聚赖氨酸或 APES 进行处理。

(2)细胞涂片和冰冻切片: 最重要的是及时固定。用 4%多聚甲醛/0.01M PBS(PH7.0-7.6)室温下固定 30-60 分钟。0.01M PBS 洗 2 分钟 $\times 2$ 次。蒸馏水洗涤 2 分钟 $\times 2$ 次。

(3)组织: 有条件时应及时固定。常规 4%多聚甲醛/0.01M PBS(PH7.0-7.6)或 10%中性缓冲福尔马林固定 4 小时以上, 石蜡包埋。切片常规脱蜡入水(脱蜡务必干净)。

2.新鲜配制 3% H_2O_2 , 室温处理 10 分钟。蒸馏水洗涤 2 分钟 $\times 3$ 次。

3.标本片加 0.01M TBS1:200 新鲜稀释 Proteinase K37°C消化 5-15 分钟, 0.01M TBS 洗 2 分钟 $\times 3$ 次。(细胞涂片和冰冻切片一般不消化或消化 10-60 秒钟。新鲜石蜡切片消化 5-10 分钟。陈旧石蜡切片消化 10-30 分钟)。

4.标本片加标记缓冲液(Labeling Buffer)20 μ l/片, 以保持切片湿润。按每张切片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μ l, 加入 18 μ l 标记缓冲液中, 混匀。甩去切片上多余液体后加标记液, 20 μ l/

片。置样品于湿盒中，37℃标记 2 小时。

5.0.01M TBS 洗 2 分钟×3 次。

6.加封闭液 50μl/片，室温 30 分钟，甩掉封闭液，不洗。

7.用抗体稀释液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体：(取 1ml 抗体稀释液加生物素化抗地高辛抗体 10μl)，混匀后 50μl/片加至标本片上。置样品于湿盒中，37℃反应 30 分钟。0.01M TBS 洗 2 分钟×3 次。

8.用抗体稀释液 1:100 稀释 SABC：取 1ml 抗体稀释液加 SABC10μl，混匀后 50μl/片加至切片。37℃反应 30 分钟。0.01M TBS 洗 5 分钟×4 次。

9.DAB 显色。

10.苏木素轻度复染。脱水，透明，封片。显微镜观察。

结果判定细胞核固缩有的呈碎片状，不规则，大小不一致，呈棕黄色颗粒者为阳性细胞。即凋亡的细胞

TUNEL 改良方法在细胞凋亡检测中的应用

材料和方法

1.1 材料 取手术下新鲜组织，恒冷切片 5μm，4%多聚甲醛缓冲液固定 4-8 小时，载玻片用 APES 处理，同时连续切片、1%火棉胶、0.01MPpH7.4PBS、3%H₂O₂、1.0M 枸橼酸盐缓冲液、通透液(0.1%Triton-100、0.1 枸橼酸钠)、标记缓冲液(pH6.8)：二甲胂酸钠 100mmol/L 标记、二巯基苏糖醇 0.1mmol/L，氯化钴(coci)。

* TdT 反应液；标记缓冲液(pH6.8)中加 TdT 酶 100U/ml，biotin-dUTP；链霉菌素标记的辣根过氧化物酶，蛋白酶 K(20μg/ml)。

* 显色剂 氨基基咔唑(amino ethyl carbazole,AEC)的 配制

AEC 20mg

二甲酰胺 DMF 2.5ml

0.05M 醋酸缓冲液(pH5.5) 50ml

0.3%H₂O₂ 0.5ml

1.2 实验步骤

- (1) 切片用冷风吹干后为防止冰冻切片脱片用 1%火棉胶封片 1 分钟, PBS 漂洗 3×5 分钟;
- (2) 3%H₂O₂ 阻断 10 分钟后 PBS 洗 3×5 分钟;
- (3) 组织切片浸泡于盛有 1.0mol/L 枸橼酸盐缓冲液的烧杯中, 置于微波炉内, 在 650W, 辐射时间 15min 的条件下进行组织处理。冷却至室温。
- (4) 放在通透液 (0.1%Triton -100 溶于 0.1%枸橼酸钠溶液) 中室温 20 分钟, PBS 漂洗 3×5 分钟;
- (5) 滴加 50μl TdT 反应液 37°C1h, PBS 漂洗 3×5 分钟; (6)滴加 50μl biotin-dUTP, 反应液 37°C1h, PBS 漂洗 3×5 分钟; (7)滴加 50μl 链霉菌标记辣根过氧化物酶液 37°C孵育 30 分钟, (8)PBS 漂洗 3×5 分钟, AEC-H₂O₂ 显色 10-15 分钟, 苏木素复染(用 1%的酸性水分化), 水洗、水溶性封片。阳性对照 dTdT 反应前用 20μg/ml 蛋白酶 K 处理切片。阴性对照用 PBS 代替 dTdT 反应液。

1.3 结果判断及标准 改良的方法: 凋亡细胞核呈红色固缩, 有白边集或碎列, 细胞膜皱褶, 有的卷曲和出泡, 在计数时避开坏死区域, 以避免假阳性。计数 500 个细胞中的凋亡细胞数目, 得出凋亡百分率。凋亡染色分度如下: 每个高倍视野平均 1-3 个为 I 级; 3-6 个为 II 级; 6-10 个为 III 级; >10 个者为 IV 级。阳性对照: 经在 dTdT 反应前用 20μg/ml 蛋白酶, 处理切片 30 分钟的切片同改良方法基本相同, 但红色较浅。阴性对照: 切片无棕色反应。

评价

正常的或正在增殖的细胞没有 DNA 的断裂, 没有 3' -OH 末端被标记, 因此镜下无显色的物质。这种分子生物学与形态学相结合的方法, 可以对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行标记, 准确反应细胞凋亡最典型的生物化学与形态学特征, 灵敏度远远高于一般的组织化学和生物化学方法。在检测过程中, 可设阴性对照(不加 TdT)阳性对照(已知的阳性标本)。注意:AEC 孵育切片, 反应产物为红色。可用苏木精对衬染色, 反应产物是纯酒精溶性的, 因此。可用酸性水溶液分化, 然后用水溶性封固剂封片。

五、凋亡细胞：凝胶电泳检测

前已提及凋亡细胞的突出特征是由于内源性核酸内切酶的激活而导致细胞核 DNA 的断裂。典型的细胞凋亡, 在核内形成大量 200bp 大小及其倍体的核苷酸片段, 而非典型的凋亡细胞, 由于核内的 DNA 降解不完全, 仅形成 300~50kb 的 DNA 大片。利用这一特性, 可通过 DNA 凝胶电泳来判定凋亡的发生和发展情况。

试剂

1. PBS 缓冲液

2. 消化液的配制:

100mmol/L NaCl

10mmol/L Tris-HCL(pH8.0)

25mmol/L EDTA(pH8.0)

0.5%SDS

0.2mg/ml 蛋白酶 K

3. 酚: 氯仿: 异戊醇混合液按 25:24:1 比例配制。

4. 氯仿: 异戊醇混合液按 24:1 比例配制。

5. 醋酸铵, 7.5mol/L。

6. 100%和 70%的乙醇。
7. TE 缓冲液(pH8.0): 100mmol/L Tris-HCL,5mmol/L EDTA。
8. TBE 缓冲液。
9. 电泳仪。
10. UV 透射仪。
11. 照相设备。
12. 不含 DNA 酶的 RNA 酶。
13. 2%凝胶的配制: 取凝胶粉 2g, 溶于 100ml 0.5 倍的 TBE 缓冲液中, 加热至沸腾, 搅拌使其均匀。待凝胶温度降至 50°C时, 倒入模板待其凝固。
- 14.溴化乙啶(EB): 10mg/ml 水溶液。
- 15.DNA 分子量标准物(Bio-Rad Lab, hercules,CA,USA)。

操作步骤

- 1.培养的悬浮细胞经离心(300g, 5min)去上清液后, 用冷(4°C)PBS 缓冲液洗涤二次; 培养的贴壁细胞经用胰蛋白酶消化后收集, 同样方法洗涤二次, 离心并去掉上清, 仅留细胞沉积物。
- 2.向细胞沉积物中加入消化液, 混匀后, 于 50°C孵育 12-16h。
- 3.用酚: 氯仿: 异戊醇混合液抽提一次, 再用氯仿: 异戊醇混合液抽提二次。其中每次加入抽提液后混匀 5min, 然后以 3600g 离心 5min, 吸取抽提物。
- 4.向抽提物中加入 醋酸铵, 至终浓度为 2.5mol/L, 混匀后, 加入二倍体积的 100%乙醇, 4°C下静置 2h。
- 5.将抽提物以 12000g 在室温下离心 30min, 弃去上清。
- 6.用 70%乙醇重复上述步骤, 洗涤一次, 弃去上清。

7.真空抽干或空气干燥 DNA 抽提物。

8.将提取的 DNA 用 TE 缓冲液溶解。

9.取 10 μ l 溶于 TB 液的 DNA 抽提物,加入 0.1U 的无 DNA 酶的 RNA 酶,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

10.吸取样品,在 2%的凝胶孔内加样;并在第一孔内加入分子量标记物。

11.将凝胶置于 0.5 倍 TBE 缓冲液的电泳槽内,按 4V/cm 电压电泳 7h。

12.将电泳后的凝胶置于 0.5 μ g/ml 的 EB 水溶液中染色 30min。

13.用双蒸水洗涤凝胶 1~2h,其间换水数次。

结果观察

将凝胶置 UV 透射仪上观察:典型的凋亡能看到 200bp 及其倍体的 DNA 梯带。

1 阴性对照

2 细胞色素诱导 16 小时

3 细胞色素诱导 36 小时(凋亡)

4 细胞色素诱导 72 小时(凋亡)

凝胶电泳特点

(1) 本方法不能检测单个细胞水平的凋亡。

(2) 不能提供细胞发生凋亡所处的组织位置和细胞分化状态。

六、荧光染料染色-流式细胞测定凋亡细胞

* 细胞凋亡在细胞学上发生一系列特征性变化,如细胞周期停滞、细胞膜表面蛋白质分子表达的水平及类型发生改变、细胞膜皱缩引起光散射性质发生相应的变化等。在细胞凋亡的早期,细胞对前向角光散射的能力显著下降,但是对 90 $^{\circ}$ 角光散射的能力增加或没有变化。前向角散射的上升或下降与细胞的大小有关,90 $^{\circ}$ 角散射的改变与细胞内结构,特别是染色质

的浓缩有关。

* 在细胞凋亡晚期，前向角和右向角光散射的能力均降低。因此，通过流式细胞仪检测细胞光散射的改变可以获得凋亡细胞的一些信息。但是，细胞的机械损伤、分离获得的细胞核、以及坏死细胞的前向角光散射能力也均表现下降。另外，晚期凋亡细胞，细胞膜表面蛋白可能丢失，凋亡细胞表型复杂化也使光散射能力的分析出现复杂的结果，因此单纯前向角光散射降低不是凋亡细胞特有的标志。

* 根据碘化丙啶(PI)只能使坏死细胞着色，而双苯并咪唑(Ho)却可穿越细胞膜对活细胞和凋亡细胞的 DNA 进行染色，在紫外光激发下产生不同颜色荧光的特点，因此采用单一 PI 或者 Ho 染色法，或者应用两种染料通过复染并结合流式细胞仪的精确分析，可达到对凋亡细胞、坏死细胞和活细胞进行鉴别与定量的目的。

七、电子显微镜观察法

透射电子显微镜已经用于凋亡细胞的检测。镜下可见凋亡细胞体积变小、细胞质浓缩、细胞核变小、染色质浓缩并凝结成块，出现染色质沿核膜内侧排列的核边集现象。晚期的凋亡细胞，清晰可见细胞核裂解产生的凋亡小体。

八、PS(磷脂酰丝氨酸)在细胞外膜上的检测：

原理

凋亡早期，细胞内膜的磷脂酰丝氨酸(PS)移位到细胞外膜，而荧光标记或生物素偶联的 annexin V(磷脂结合蛋白)极易检测处于外膜的 PS，由于 PS 外膜化比凋亡引起的核酸变化更早，所以该试剂盒比 DNA 检测法能更早期检测细胞凋亡。

九、mRNA 水平的检测

一些基因在细胞凋亡时表达异常,检测这些特异基因的表达水平也成为检测细胞凋亡的一种常用方法。作为凋亡前期 (Bax) 或抗凋亡 (Bcl-2 和 bcl-X) 的调节物,它们的表达水平比例决定了细胞是凋亡还是存活。因此,通过定量 PCR (Quantative PCR) 检测这些凋亡相关基因 RNA 水平的表达,也可以对凋亡进行评价

十、凋亡相关蛋白 TFAR19 蛋白的表达和细胞定位分析

该分子表达广泛,在原核和真核生物不同种属间具有很高的同源性。该分子具有促进某些肿瘤细胞(HL60、MGC-803、MCF-7 等)凋亡的效应,可作为早期凋亡的信号评价指标。

十一、活细胞 Bid(蛋白)转位检测

Bcl2 家族蛋白 Bid 通常情况下位于细胞浆内,但在凋亡发生时, Bid 迅速转入线粒体内,并引发了细胞色素 C 的释放,因此,通过 Bid 蛋白的检测可以监视凋亡前期的生化反应。

细胞凋亡相关抗体

* Fas(CD95)Monoclonal Antibody

* Granzyme B Monoclonal Antibody

* Fas Monoclonal Antibody

* Apoptosis Sample

* Bak Antibody

* Bcl-xL Antibody

* Caspase-10 Antibody

* Cleaved Caspase-3

* Cleaved DFF45(D224)Antibody

* Cleaved PARP(D214)Antibody

* DFF45/DFF35 Antibody

* Phospho-Bcl-2(Ser70)Antibody

细胞凋亡的医学意义

1. 凋亡在发生学中的作用

①在胚胎发育、器官形成过程中，必然伴随着某些特定细胞群的凋亡，这些细胞群的凋亡是受基因控制的，可准时发生，呈现生理性细胞死亡或进行性细胞凋亡。

②淋巴系统的阴性选择(negative selection)，指在 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞分化成熟时，机体经过严格的选择机制，使那些编排细胞表面受体基因发生错误的细胞，以及有可能导致自身免疫性疾病的细胞(具有自身抗原的细胞)发生凋亡，使得淋巴细胞在成熟过程中，有 95%的细胞以凋亡的方式被清除，仅有 5%左右的淋巴细胞从中枢免疫器官中被分化成熟。

③神经元发育过程中也存在阴性选择机制，以清除那些有害的(即发生错误连接的)或无用的神经元，因此，有 50%的神经元细胞在发育成熟前以凋亡的方式被清除。

2. 凋亡与疾病

现已发现凋亡机制的异常，即凋亡的增加或被抑制与一系列疾病的发生有关。

(1) 凋亡减少(抑制)所引起的疾病

①恶性肿瘤：有滤泡性淋巴瘤、P53 突变性肿瘤、激素依赖性肿瘤(乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌)。

②自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮、自身免疫性肾小球肾炎。

③病毒感染性疾病如对疱疹病毒、麻疹病毒、腺病毒易感性引起的疾病。

(2) 凋亡增多引起的疾病

①神经元变性，如帕金森病、侧索硬化、色素性视网膜炎、小脑变性。

② 骨髓发育不良综合征，如再生性障碍性贫血。

③ 缺血性损伤，如心肌梗死、卒中、再灌注性损伤。

④ 中毒性肝炎，如酒精性肝病。

凋亡除与某些疾病发生有关，而且对许多疾病的治疗有着极大的现实意义。肿瘤患者可通过基因治疗启动细胞凋亡机制，也可通过药物(化疗)来诱导和加速肿瘤细胞凋亡，以控制肿瘤的发展，并使其缓解。如在外科手术及器官移植中的再灌注性损伤，可采取启动抗凋亡基因或应用抗凋亡药物，来促进愈合和恢复功能。