



# 产品说明书

---

## DeadEnd™ 荧光测定 TUNEL 系统

G3250 产品使用说明书

[www.promega.com](http://www.promega.com)

# DeadEnd™ 荧光测定TUNEL系统

全部技术文献英文原版均可在因特网上得到 [www.promega.com/tbs](http://www.promega.com/tbs)

请访问该网站以保证您所使用的是这份技术报告的最新版本。如对此方法的使用有任何疑问，请联系Promega技术服务部门。发送电子邮件至 [chinatech@promega.com.cn](mailto:chinatech@promega.com.cn)。

1. 说明.....	1
2. 产品组成和储存条件.....	4
3. 注意事项.....	4
A. 光敏性.....	4
B. 安全性.....	4
4. 实验方案.....	4
A. 贴壁细胞凋亡的检测步骤.....	6
B. 石蜡包埋组织的预处理.....	9
C. 流式细胞术检测悬浮细胞的步骤.....	10
D. 荧光显微镜检测悬浮细胞的步骤.....	12
E. DNA酶处理阳性对照的步骤.....	12
5. 操作实例：喜树碱（Camptothecin）或茴香霉素（Anisomycin）诱导的HL-60细胞凋亡的检测.....	13
6. 问题诊断.....	16
7. 缓冲液和溶液的组成成分.....	17
8. 相关产品.....	18
9. 参考文献.....	20

## 1. 说明

DeadEnd™荧光测定TUNEL系统(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，提供简单、准确和快速的方法在单细胞水平或细胞悬液中原位检测凋亡细胞。该系统可在多种环境中检测凋亡细胞的死亡，如细胞培养物，和甲醛固定、石蜡包埋的组织切片。DeadEnd™荧光测定TUNEL系统测量的是核DNA断裂，它在许多细胞类型中是凋亡的一个重要生化标志。

大部分高等真核生物的细胞当不再被需要或者已被严重破坏时，具有激活内源细胞自杀程序自我毁灭的能力。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，包括膜起泡，核和细胞质收缩和染色质凝聚。在它的最初定义之后，凋亡广泛用于程序性细胞死亡所具有的所有生化和形态特征。

凋亡垂死的细胞往往分割成膜结合的凋亡小体，这些凋亡小体可以随时被巨噬细胞或其相邻的细胞吞噬和消化而不产生炎症反应。这与已知的坏死的细胞死亡形式是相反的，坏死的特点是细胞肿胀、染色质絮凝、膜的完整性破坏、细胞裂解和发生局部炎症反应。

凋亡在发育和维持平衡、神经和免疫系统的成熟过程中起重要作用。它也是机体的重要防御机制，可消除不必要和有潜在危险的细胞，如自反应淋巴细胞、病毒感染的细胞和肿瘤细胞。与其有利效应相反的是，细胞凋亡不恰当的激活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的神经元细胞的损失和后续的缺血性中风（1-8）。

细胞凋亡是一种基因控制的过程，而细胞凋亡的一些机制在整个进化过程中至少是部分保守的。进行细胞凋亡（组成型）的基本机制存在于所有哺乳动物；但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，细胞凋亡的特点是通过内源性内切酶作用产生DNA断裂片段（11-14）。凋亡细胞的DNA被切成180-200bp的多聚体片段，与单个核小体的大小相符。因此，凋亡细胞DNA在琼脂糖凝胶上别具特色的迁移形成一个180-200bp多聚体的阶梯。单链断裂的产生也有报道（15）。

## 检测原理

DeadEnd™荧光测定TUNEL系统通过应用重组末端脱氧核苷酸转移酶（rTdT酶）在DNA的3'-羟基（3'-OH）末端催化掺入荧光素-12-脱氧三磷酸尿苷（fluorescein-12-dUTP）来测量凋亡细胞的断裂的DNA。rTdT应用TUNEL（TdT介导的脱氧三磷酸尿苷缺口末端标记法，TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling）原理形成一个多聚尾（16）。然后，荧光素-12-脱氧三磷酸尿苷标记的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）。

## 2. 产品组成和储存条件

Product	Size	Cat.#
DeadEnd™荧光测定TUNEL系统	60 次	G3250

包含：

- 9.6ml 平衡缓冲液
- 300µl 核苷混合物 (6 × 50µl)
- 3 × 20µl 重组末端脱氧核苷酸转移酶
- 70ml 20X SSC
- 10mg 蛋白酶K
- 60 塑料盖玻片

**储存条件：**平衡缓冲液、rTdT酶和蛋白酶K储存于-20°C。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一旦解冻后储存于室温。

本系统配备的蛋白酶K在使用前需用1ml的蛋白酶K缓冲液（见第7节）溶解。最后得到的蛋白酶K缓冲液为10mg/ml。将分成小份的蛋白酶K溶液储存于-20°C，在-20°C该酶至少六个月内是稳定的。

## 3. 注意事项

### 3.A. 光敏性

本系统提供的核苷混合物是对光敏感的。核苷混合物以及反应混合物和包含核苷混合物的载玻片要避免光照。

### 3.B. 安全性

平衡缓冲液包含二甲胍酸钾（potassium cacodylate，二甲基苯甲酸）。避免接触皮肤和眼睛。**使用该试剂时戴好手套和安全眼镜。**

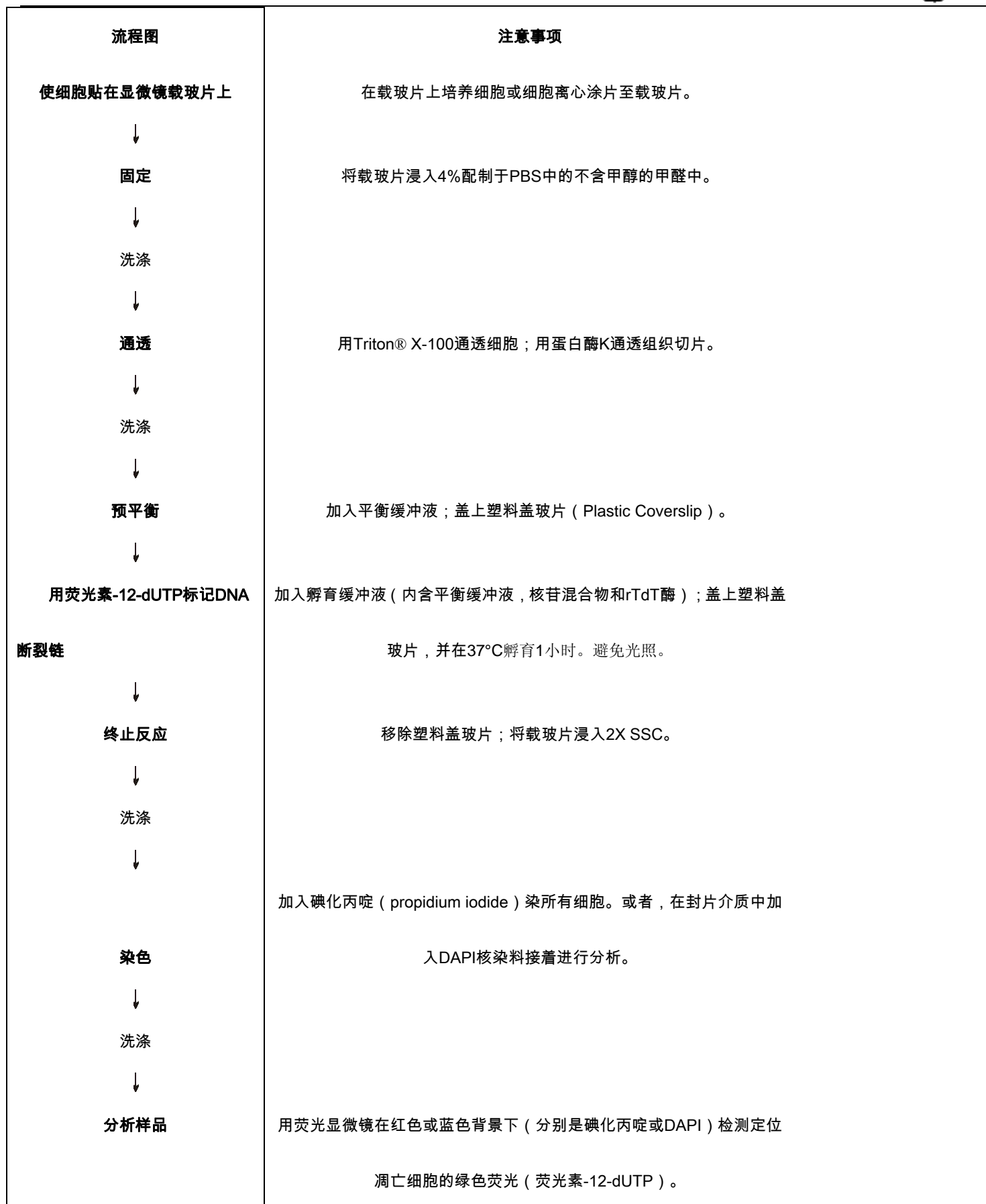


图 1. 贴片细胞在荧光显微镜下使用 DeadEnd™ 荧光测定 TUNEL 系统的流程概览。

#### 4. 实验方案

为确保您为进行该试验做好了充分的准备，请在尝试应用DeadEnd™荧光测定TUNEL系统之前阅读下述全部材料。缓冲液组成成分列在第7节。

##### 请使用者自备：

- PBS
- 碘化丙啶 (Sigma 目录号# P4170)
- 可自由选择：*SlowFade*<sup>®</sup> *Light* Anti-Fade Kit (Molecular Probes Cat.# S7461) or VECTASHIELD<sup>®</sup> (Vector Labs Cat.# H-1000)
- 可选的：VECTASHIELD<sup>®</sup> + DAPI (Vector Labs 目录号# H-1200)

##### 样品是培养的细胞还需准备：

- 1%配制于PBS中的不含甲醇的甲醛 (Polysciences目录号# 18814)
- 4%配制于PBS中的不含甲醇的甲醛 (Polysciences目录号# 18814)

**注意：**多聚甲醛可直接替代不含甲醇的甲醛。

- 70% 乙醇
- 0.2% 配制于PBS中的Triton<sup>®</sup> X-100溶液
- 0.1% 配制于PBS中的Triton<sup>®</sup> 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
- 不含DNA酶的RNA酶A (DNase-free RNase A)

##### 样品是石蜡包埋的组织切片的还需准备：

- 4%配制于PBS中的不含甲醇的甲醛 (Polysciences 目录号# 18814)

**注意：**多聚甲醛可直接替代不含甲醇的甲醛。

- 二甲苯
- 乙醇：100%、95%、85%、70%和50%溶于去离子水
- 0.85% NaCl 溶液
- 蛋白酶K缓冲液
- DNA酶I
- DN酶I 缓冲液

##### 请使用者自备的设备

##### 如果样品是培养的贴壁细胞和组织切片

- 多聚赖氨酸 (poly-L-lysine) 包被的或硅化显微镜载玻片，例如Poly-Prep<sup>®</sup> slides (Sigma 目录号# P0425) 或其它合适的预处理载玻片，如Superfrost<sup>®</sup> Plus glass slides (Fisher 目录号# 12-550-15)或Lab-Tek<sup>®</sup> Chamber Slides (Nunc 目录号# 177380)
- 细胞刮刀
- 染色缸 (科普林缸, Coplin jars) (可自选做的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°C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

- 台式离心机
- 37°C培养箱或37°C有水浴锅
- 多聚赖氨酸 (poly-L-lysine) 包被的或硅化显微镜载玻片, 例如Poly-Prep® slides (Sigma Cat.# 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. 贴壁细胞凋亡的检测步骤

### 载玻片的准备

准备足够数量的多聚赖氨酸包被的载玻片, 够阳性和阴性对照以及所有的实验样本用。

**多聚赖氨酸包被的载玻片的准备:** 吸取50–100µl 0.01% (重量体积比) 多聚赖氨酸水溶液 (Sigma Cat.# P9155或Sigma Cat.# 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。在将要用于固定细胞的区域将多聚赖氨酸溶液涂散为一薄层。在载玻片干了之后, 迅速用去离子水漂洗, 然后让包被的载玻片在空气中晾干30-60分钟。多聚赖氨酸包被的载玻片在使用前能在室温储存数月。

**贴壁细胞贴到载玻片的准备:** 在Lab-Tek®载玻片小室 (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, 直接进行下述的凋亡检测试验。

### 凋亡检测

1. 固定细胞, 将载玻片浸入装有4%新鲜配制于PBS (pH 7.4) 中的不含甲醇的甲醛的染色缸中, 在4°C放置25分钟。

**注意:** 多聚甲醛可直接替代不含甲醇的甲醛。

2. 洗涤载玻片, 将其浸入新鲜的PBS中, 在室温放5分钟。重复用PBS洗。

**注意:** 完成第2步之后, 载玻片可以在70%乙醇中–20°C的条件下或在PBS中4°C的条件下储存两周。

3. 通透细胞, 将载玻片浸入0.2% 配制于PBS中的Triton® X-100溶液, 放置5分钟。

4. 洗载玻片, 将其浸入新鲜的PBS中, 在室温放置5分钟。重复用PBS洗。

**注意:** 自己选做的使用DNA酶I的**阳性对照**载玻片可参照4.E节中所描述的在第4步进行准备。

5. 轻叩载玻片以去掉多余的液体。用100µl平衡缓冲液覆盖细胞。在室温下放置5-10分钟平衡。

6. 在平衡细胞的同时, 在冰上解冻核苷混合物, 并且依照表1, 准备足够量的用于所有实验的和可选阳性对照反应 (见4.E节) 的rTdT孵育缓冲液。对于面积小于5cm<sup>2</sup>的一个标准反应, 其体积是50µl, 用50µl乘上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, 可成比例的增大试剂体积。

**注意:** 将核苷混合物和rTdT孵育缓冲液放置于冰上, 避光。

表1. 准备用于实验的和可选阳性对照反应的rTdT孵育缓冲液

缓冲液成分	每50µl标准反应中的成分 体积	反应数目(实验反应+可选阳性对 照)	成分体积
平衡缓冲液	45µl	x	= _____µl
核苷混合物	5µl	x	= _____µl
rTdT酶	1µl	x	= _____µl
<b>rTdT孵育缓冲液总体积</b>			<b>= _____µl</b>

**适用于阴性对照:** 准备一份不含rTdT酶的对照孵育缓冲液: 混合45µl平衡缓冲液、5µl核苷混合物和1µl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 $\mu$ l反应。)按第7步到第16步进行阴性对照。

**适用于阳性对照:** 如果需要阳性对照的话,请参照4.E节中的步骤操作。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 $\mu$ l平衡缓冲液中的大部分,然后在5cm<sup>2</sup>面积的细胞上加上50 $\mu$ 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。

①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保证试剂的平均分布。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°C孵育60分钟发生加尾反应。将湿盒用铝箔纸包裹以避免光照。

9. 用去离子水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中的2X SSC,室温放置15分钟以终止反应。

① 确保20X SSC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-脱氧三磷酸尿苷。

11. 样本在染色缸中染色,在黑暗中将载玻片浸入装有40ml碘化丙啶溶液的染色缸,室温放置15分钟,此处碘化丙啶溶液是用PBS新配稀释到1 $\mu$ g/ml的。

**可选操作:** 省略碘化丙啶的步骤,而将载玻片用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,在含处理好的细胞区域加上一滴Anti-Fade solution (Molecular Probes Cat.# 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,并让它晾干5-10分钟。

16. 立即在荧光显微镜下分析样本,用标准的荧光过滤装置在520  $\pm$  20nm的荧光下观察绿色荧光;在>620nm下观察碘化丙啶的红色荧光,以及在460nm观察蓝色的DAPI。如有必要,载玻片能在4°C黑暗条件下存放过夜。

**注意:** 碘化丙啶将凋亡和未凋亡的细胞都染成红色。只在凋亡的细胞核中才有荧光素-12-dUTP掺入而定位的绿色荧光。

#### 4.B. 石蜡包埋组织的预处理

组织切片可能是甲醛固定和石蜡包埋后用多种技术切成的。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,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,室温放置5分钟。

3. 样本顺序脱水,将样本浸入梯度浓度的乙醇洗液(100%, 95%, 85%, 70%, 50%),室温下每步放置3分钟。

4. 样本洗涤,将载玻片浸入0.85% NaCl,室温放置5分钟。

5. 样本洗涤,将载玻片浸入PBS,室温放置5分钟。

6. 组织切片固定,将载玻片浸入4%配制于PBS中的不含甲醇的甲醛溶液,室温放置15分钟。

**注意:** 多聚甲醛可直接替代不含甲醇的甲醛。

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,并将载玻片放置于一个平面。用PBS1:500稀释蛋白酶K储液(10mg/ml;见第2节),配成20 $\mu$ g/ml的蛋白酶K溶液。在每片载玻片上加上100 $\mu$ l 20 $\mu$ 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帮助组织和细胞对后续步骤的染色试剂通透。为得到最好的结果,需要优化蛋白酶K孵育的时间。厚度超过4-6 $\mu$ m的组织切片需要更长时间的孵育;然而,蛋白酶K孵育的延长,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,室温放置5分钟。

10. 组织切片洗涤后固定,将载玻片浸入4%配制于PBS中的不含甲醇的甲醛溶液,室温放置5分钟。

11. 样本洗涤,将载玻片浸入PBS,室温放置5分钟。

**注意:** 在第11步可以准备选做的**阳性对照**载玻片,采用的是用DNA酶I处理样本促使DNA断裂的方法。4.E节中给出了DNA酶处理的流程。

12. 遵循4.A中的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. 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 1%配制于PBS中的不含甲醇的甲醛溶液，冰上放置20分钟。

**注意：**多聚甲醛可直接替代不含甲醇的甲醛。

3. 细胞在4°C  $300 \times g$ 离心10分钟，去上清并且重悬于5ml PBS。重复洗一次并把细胞重悬在0.5ml PBS中。

4. 通透细胞，加入5ml冰上预冷的70%乙醇，在-20°C 孵育4小时。细胞能在70%乙醇中-20°C的条件下保存一周。

**或者，**细胞可用0.2% 配制于PBS中的Triton® X-100溶液通透，室温放置5分钟。

5. 细胞在 $300 \times g$ 离心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 $2 \times 10^6$ 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 $\mu$ l平衡缓冲液中。室温孵育5分钟。

8. 在平衡细胞的同时，在冰上解冻核苷混合物，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 $2 \times 10^6$ 个细胞的一个标准反应，其体积是50 $\mu$ l，用50 $\mu$ l乘上反应数目来确定所需rTdT孵育缓冲液的总体积。

**注意：**将冻核苷混合物和rTdT孵育缓冲液放置于冰上，避光。

表2. 准备用于实验反应的rTdT孵育缓冲液

缓冲液成分	每50 $\mu$ l标准反应中的成分 体积	反应数目(实验反应+自选阳性对照)	成分体积
平衡缓冲液	45 $\mu$ l	x	= _____ $\mu$ l
核苷混合物	5 $\mu$ l	x	= _____ $\mu$ l
rTdT酶	1 $\mu$ l	x	= _____ $\mu$ l
<b>rTdT孵育缓冲液总体积</b>			<b>= _____<math>\mu</math>l</b>

**适用于阴性对照：**准备一份不含rTdT酶的对照孵育缓冲液：混合45 $\mu$ l平衡缓冲液、5 $\mu$ l核苷混合物和1 $\mu$ l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 $\mu$ l反应。）按照第9步到第14步进行阴性对照反应。

9. 细胞在 $300 \times g$ 离心10分钟，去上清并把沉淀重悬在50 $\mu$ l 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。

①在第9步完成之后避免载玻片见光。

10. 加入1ml 20mM EDTA终止反应。轻柔涡旋混匀。

11.  $300 \times g$ 离心10分钟，去上清并把沉淀重悬在1ml 0.1% 配制于PBS中的Triton® X-100溶液，其中含5mg/ml牛血清白蛋白（BSA）。重复一次，总共洗两次。

12.  $300 \times g$ 离心10分钟，去上清并把细胞沉淀重悬在0.5ml 碘化丙啶溶液中（用PBS新配稀释到5 $\mu$ g/ml），其中包含250 $\mu$ g 无DNA酶的RNA酶A。

13. 在黑暗中室温孵育细胞30分钟。

14. 用流式细胞仪分析细胞。测量520  $\pm$  20nm的荧光素-12-脱氧三磷酸尿苷的绿色荧光和>620nm的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。只在凋亡的细胞核中有荧光素-12-脱氧三磷酸尿苷掺入而定位的绿色荧光。

#### 4.D. 荧光显微镜检测悬浮细胞的步骤

在适当的培养液中培养悬浮细胞。接下来进行诱导凋亡的对照或者实验处理，在4°C下 $300 \times g$ 离心10分钟，去除培养液，小心避免吸掉细胞。用上述离心的方法在PBS中洗细胞，然后以大概 $2 \times 10^7$ 个细胞/ml的浓度将细胞重悬在PBS中。吸50-100 $\mu$ l细胞悬液滴于多聚赖氨酸包被的或者硅化的显微镜载玻片上。用一片干净的载玻片轻柔的涂开细胞悬液。如4.A节所述分析凋亡的细胞。细胞离心涂片的制备也可以从悬浮细胞准备，并用4.A节所述进行分析。



#### 4.E. DNA酶处理阳性对照的步骤（可选的）

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节所述的第1-4步进行。在第4步之后，像下面叙述的操作用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节所述的1-11操作，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DNA3'-羟基末端。下面叙述的流程通常会引起被处理的大多数细胞显现绿色荧光。

1. 加100 $\mu$ l DNA酶I缓冲液（第7节）到固定的细胞上，室温孵育5分钟。
2. 轻叩掉液体，加入100 $\mu$ l 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，并将载玻片在装有去离子水的染色缸中彻底洗3-4次，该染色缸是专门用于阳性对照的。
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。

**适用于生物学阳性对照：**多种方法可诱导实验样本的凋亡。

- 用蛋白合成抑制剂（茴香霉素）或者DNA拓扑异构酶I抑制剂（喜树碱）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，缺乏NGF的PC12细胞或培养的交感神经元会诱导凋亡(22)。
- 用糖皮质激素、地塞米松体外处理会引起小鼠胸腺淋巴细胞的凋亡(16, 23)。
- 分别用配体或者与激动剂抗体交联激活Fas或者TNF-受体-相关的细胞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细胞凋亡的检测

1. 在含10%胎牛血清、2mM 谷氨酸、1%的青霉素和链霉素的RPMI 1640培养液中培养HL-60细胞，置于37 $^{\circ}$ C湿润的5% CO<sub>2</sub>培养箱中。
2. 将细胞密度调至 $6 \times 10^5$ 个细胞/ml。喜树碱处理的终浓度为0.2 $\mu$ g/ml（储液溶解在DMSO中），在37 $^{\circ}$ C湿润的5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育5小时。茴香霉素处理的终浓度为2 $\mu$ g/ml（储液溶解在DMSO中），在37 $^{\circ}$ C湿润的5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育2小时。阴性对照的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. 收细胞，遵循4.C节中所述的第1-14步用流式细胞仪来分析悬液中的凋亡细胞。

图2和3显示用对照和喜树碱处理过的细胞产生的数据。

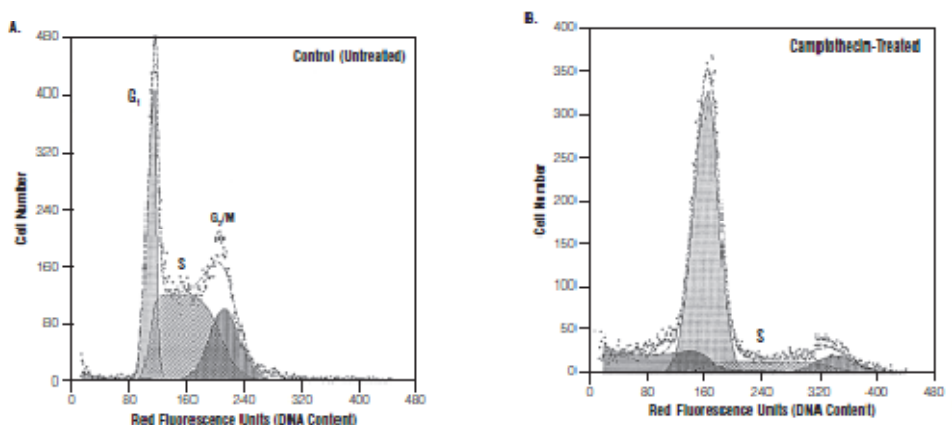


图2. 流式细胞分析喜树碱诱导的HL-60细胞的凋亡。

HL-60细胞在有或无喜树碱的条件下培养，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）分析细胞悬液中的凋亡细胞。对照（未处理的）HL-60细胞（A组）和喜树碱处理的HL-60细胞（B组）的DNA频率分布直方图如图所示。用MultiCycle软件(Phoenix Flow System)分析了细胞周期；用Elite™ 软件(Beckman Coulter, Inc.)进行了DNA含量分析。

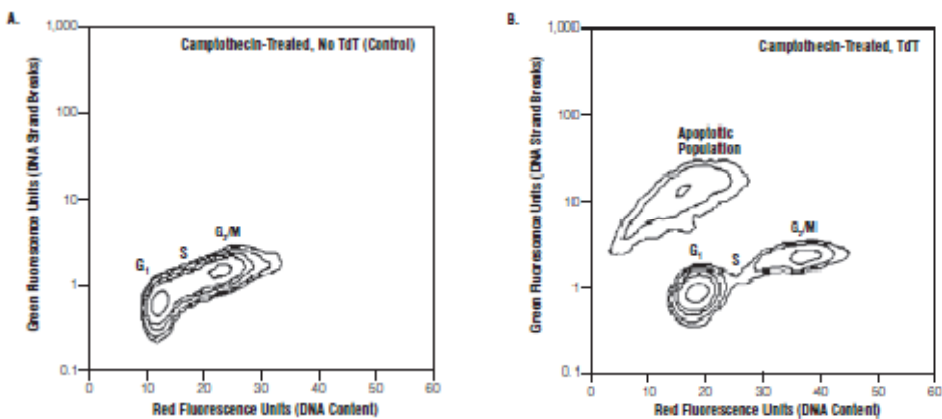


图 3. 在TdT酶存在 (B组) 或不在 (A组) 的条件下检测喜树碱诱导的HL-60细胞的凋亡。流式细胞术分析如图2所述进行。用Elite™ 软件(Beckman Coulter, Inc.)分析了DNA链断裂。

## 6. 问题诊断

对于此处未提及的问题, 请联系010-58656268, chinatech@promega.com.cn.

### 问题表现

### 原因和评论

高背景 (如, 未凋亡细胞的强绿色荧光背景)

非特异性掺入荧光素-12-脱氧三磷酸尿苷。不要让细胞在4.A节第8步或其之外的步骤干掉。

在4.A节第10步, 载玻片在用PBS洗一遍之后, 可再用含0.1% Triton® X-100和5mg/ml牛血清白蛋白 (BSA) 的PBS洗三次, 每次5分钟。

几乎没染或染色不好

蛋白酶K或Triton® X-100的通透不充分。通过调整通透剂的孵育时间优化通透步骤。

组织切片从载玻片上脱落

组织切片粘附之前的包被不充分。在根据参考文献17所述步骤展片之前, 用3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (3-aminopropyl triethoxysilane, TESP; Sigma Cat.# 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。

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。

最后显微镜或流式细胞仪分析只剩下很少的细胞

在操作过程中丢失大量细胞:

- 提高起始的细胞量。
- 在4.D节中, 制备贴到显微镜载玻片的细胞悬液时, 离心过程中用含1% BSA的PBS洗细胞。
- 如果可以的话, 使用甩片机离心以使细胞粘附到显微镜载玻片。
- 在4.C节第1步制备细胞悬液时, 离心过程中用含1% BSA的PBS洗细胞。

## 7 缓冲液和溶液的组成成分

### 平衡缓冲液

200mM 二甲胂酸钾 (potassium cacodylate)  
(pH 6.6, 25°C)

25mM Tris-HCl  
(pH 6.6, 25°C)

0.2mM DTT

0.25mg/ml BSA

2.5mM 氯化钴 (cobalt chloride)

### 蛋白酶K缓冲液

100mM Tris-HCl (pH 8.0)

50mM EDTA

### 核苷混合物

50μM 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碘化丙啶溶于10ml PBS中。在0-4°C避光储存溶液。使用时适量稀释。

### 20X SSC

87.7g NaCl

44.1g 柠檬酸钠 (sodium citrate) 溶于400ml去离子水。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 MgCl<sub>2</sub>

10mM CaCl<sub>2</sub>

### 1X PBS (pH 7.4)

137mM NaCl

2.68mM KCl

1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### rTdT孵育缓冲液

混合下面的物品:

90μl 平衡缓冲液

10μl 核苷混合物

2μl rTdT酶

这个量够做两个反应。在冰上解冻组分。在使用前即刻准备混合物，并且在准备完毕之前注意避光放置于冰上。

### 1% 甲醛溶液

将6.25ml 16%不含甲醇的甲醛混入90ml PBS。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%不含甲醇的甲醛混入70ml PBS。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储存溶液，在4°C至少两周是稳定的。

### 10% Triton® X-100溶液

在烧杯中混合85ml高压灭菌去离子水和10ml Triton® X-100溶液，放置于搅拌处用磁力搅拌棒混匀。用水定容至100ml。

## 8. 相关产品

## 9. 参考文献