

## 使用 TUNEL 分析评估 DNA 片段化

细胞凋亡或程序性细胞死亡是一种高度复杂的细胞途径。 响应于凋亡刺激，细胞将经历一系列受控步骤，导致重要细胞组分的有组织的破坏，分选和再循环。 凋亡细胞可以通过不同的形态学和生物化学标记物来表征，因为它们沿细胞凋亡途径向下进展。 这些特征可包括细胞收缩，染色质浓缩，膜结合的凋亡小体的形成和质膜外膜上的磷脂酰丝氨酸（PS）磷脂的表达。 然而，被认为是凋亡细胞的“标志性”指标的该途径的一部分是通过活化的内切核酸酶对核小体间 DNA 的片段化以及通过由邻近细胞吞噬的凋亡小体水平转移该遗传物质。

细胞凋亡 DNA 片段化是内切核酸酶 DNA 片段化因子或 DFF 的 DNA 降解的结果。 Wang 及其同事（Liu 等人，1997）将 DFF 鉴定为由 DNA 片段化因子 45 和 40（DFF45 和 DFF40）组成的异二聚体蛋白质。 DFF45 表现为阻碍 DFF40 裂解功能的抑制剂。通过效应酶半胱天冬酶 3 切割 DFF45 引发 DFF40 的活化。在 DFF45 解离后，活化的 DFF40 可以在核小体间位点引发染色体 DNA 的切割。在这些位点的切割导致寡核小体 DNA 片段的大小约为 180-200 个碱基对。使用琼脂糖凝胶电泳可以将这种 DNA 片段的鉴定可视化为梯状图案。然而，这种技术费力，耗时并且主要用于收集定性数据。对于检测核小体间 DNA 片段化的更复杂和成熟的方法，我们建议使用末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记或 TUNEL 测定。

## TUNEL Assay

### 原理

TUNEL 测定法是一种原位 DNA 染色技术，对检测 DNA 链断裂或 DNA 片段化敏感。它采用称为末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）的专门 DNA 聚合酶，用染料修饰的 dUTP 核苷酸检测并酶促标记片段化 DNA 的游离 3'-OH 末端。借助荧光仪器，可以观察和测量 TUNEL 标记的 DNA 片段。与定性琼脂糖凝胶电泳方法相反，TUNEL 测定提供单细胞水平的细胞凋亡的定量检测（图 1）。

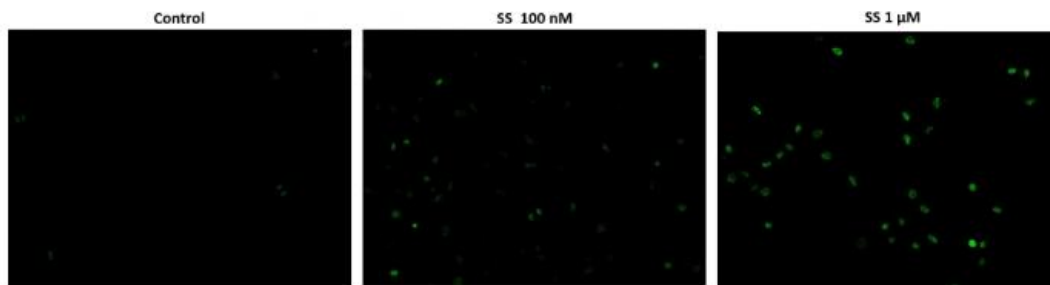


图 1. 与未处理的对照相比，用 100nM 或 1  $\mu$ M 星形孢菌素（SS）处理 4 小时的 HeLa 细胞中 TUNEL 反应的荧光图像。将细胞与反应混合物在 37°C 温育 1 小时。使用具有 FITC 滤光器组的荧光显微镜分析绿色荧光信号。荧光标记的 DNA 链断裂在 SS 处理的细胞中显示出强烈的荧光染色。

多年来，TUNEL 技术的几种变体已经针对各种生色和荧光检测形式进行了设计和优化。显色 TUNEL 检测非常适合我们的组织样本。然而，荧光 TUNEL 测定被设计用于悬浮或贴壁细胞样品。几个变量影响 TUNEL 测定的染色动力学。这些变量中的一些包括试剂浓度，样品固定和 DNA 链断裂的可及性，其可在组织或细胞样品类型之间变化。因

此，使用阳性和阴性对照标准化您选择的 TUNEL 测定可以减轻这些潜在影响，从而减少检测错误信号的机会。有关详细的说明，包括正负控制步骤，请参阅下面的 TUNEL 说明。

用于检测 DNA 片段化的几种试剂盒是可商购的。由于竞争产品之间存在如此多的可能性和差异，因此选择合适的 TUNEL 分析可能会非常困难。为了帮助选择过程，我们推荐 Cell Meter™TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒，可提供绿色或红色荧光发射。这些绿色和红色 TUNEL 分析使用分别称为 Tunnelyte™Green 和 Tunnelyte™Red 的专有染料修饰的 dUTP 核苷酸。Tunnelyte™Green 在 497 nm 处的峰值吸收使其非常适合配备 488 nm 氩激光线的仪器进行高效激发。虽然 Tunnelyte™Red 在 556 nm 处的峰值吸收被配备有氦离子激光器的仪器有效激发。两种探针都与 DNA 染色染料如 Hoechst (Cat # 17523)，DAPI (Cat # 17511) 或 Nuclear Violet™LCS1 (Cat # 17543) 完全分离，从而制成任何合适的 DNA 复染染料。

与其他商业上可获得的 TUNEL 分析相比，平均单价为 45 美元，平均单位为 45 次测试，Cell Meter™TUNEL 分析提供最佳价值，每个套件的价格为 295 美元，单位大小为 50 次。此外，Cell Meter™TUNEL 试剂盒中提供的反应缓冲液不含极其危险的砷化合物，二甲胂酸钠。高度致癌和有毒的砷化合物使得来自其他供应商的 tunel 检测试剂盒极难被处理，储存和处理。

**TUNEL 分析方案（样品类型：贴壁或非贴壁细胞）**

## 准备细胞培养:

1. 根据您的具体方案, 培养细胞以达到诱导细胞凋亡的最佳密度。

对于在 96 孔微孔板培养物中生长的贴壁细胞, 我们建议每孔约 30,000 至 50,000 个细胞。

对于非粘附细胞, 我们建议约  $1$  至  $2 \times 10^6$  个细胞/ mL。

2. 同时, 针对每种标记条件培养与诱导样品相同规格的非诱导阴性对照细胞群。

注意: 对于使用 HeLa 细胞的样本, 我们建议用  $100\text{nM}$  -  $1\ \mu\text{M}$  的星形孢菌素处理细胞 4 小时以诱导细胞凋亡。

## 固定和透化:

1. 删除细胞培养基。

2. 对于贴壁细胞, 向每个孔中加入  $100\ \mu\text{L}$ /孔/ 96 孔板的 4% 甲醛固定缓冲液。

注意: 对于非粘附细胞, 添加所需量, 例如  $2 \times 10^6$  个细胞/ mL 的 4% 甲醛固定缓冲液。

3. 在室温下孵育平板 20 至 30 分钟。

4. 去除固定剂。

固定后改善渗透性的可选步骤: 向每个孔中加入  $100\ \mu\text{L}$ /孔/ 96 孔板的透化试剂, 例如 PBS 中的 0.2% Triton X-100, 并在室温下孵育平板 10 分钟。

5. 用 PBS 洗涤细胞 2 至 3 次。

任选的阳性对照步骤: 为了制备 TUNEL 反应的阳性对照, 在室温下用 DNase 1 消化细胞 30 分钟, 然后进行 TUNEL 反应。

## TUNEL 反应:

注意：在开始 TUNEL 反应之前，应对每个细胞系进行单独评估，以确定最佳细胞密度。

1. 根据待测样品的数量准备反应混合物：

将 0.5  $\mu$ L 100XTunneLyte™Green 加入 50  $\mu$ L 反应缓冲液中，总体积为 50.5  $\mu$ L。

2. 向每个样品中加入 50  $\mu$ L 新制备的反应混合物（来自步骤 8.1），并在 37°C 下孵育 60 分钟。

3. 除去反应混合物，用 200  $\mu$ L/孔的 PBS 将细胞处理 3 至 5 次。

4. 使用荧光显微镜，流式细胞仪或荧光酶标仪在 Ex / Em = 490 / 520nm 处监测荧光强度。

可选：用 1X Hoechst（组分 C，Ex / Em = 350 / 460nm）对核进行图像分析

货号	产品名称	规格 (tests)	价格(元)	激发 (Ex) nm	发射 (Em) nm
22849	Cell Meter™ TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒* 绿色荧光*	50	3540	497	520
22844	Cell Meter™ TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒* 红色荧光*	50	3540	556	579