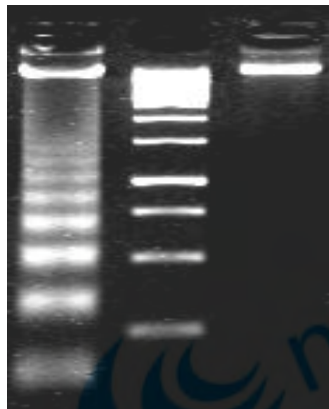


3. DNA片段化检测

细胞凋亡的一个显著特点是**细胞染色体DNA的片段化**，在一些内源性核酸内切酶的作用下，核小体间的**DNA**被切断，从而产生不同长度的寡聚核小体片段，表现为琼脂糖凝胶电泳中呈现特异的**180-200 bp DNA Ladder**图谱。



利用这一特征，人们建立了**TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling)** 方法，其原理为：**TdT**在凋亡细胞断裂DNA的3'-OH末端催化掺入荧光(**FITC**或**TRITC**)标记的**dUTP**，然后用荧光显微镜直接观察或者用流式细胞仪定量检测，可以判断出细胞凋亡情况。



操作流程：

1) 样品预处理：

石蜡包埋切片：脱蜡 → 水化 → 洗涤 → 通透 → 洗涤

组织冰切片：固定 → 洗涤 → 通透 → 洗涤

贴壁细胞或细胞涂片：洗涤 → 固定 → 洗涤 → 通透 → 洗涤

悬浮细胞：离心洗涤 → 固定 → 离心洗涤 → 通透 → 离心洗涤

2) DNase I处理阳性对照（可选）

3) 配制TUNEL检测液：计算好样本数量（包括实验组和阳性对照组），参考下表配制适当量的TUNEL检测液，即用即配，注意避光。

组分	体积 (μ l/50 μ l 体系)
TdT Enzyme (10 $\times$)	5
FITC-12-dUTP Labeling Mix	45

操作流程：

4) 标记与检测：

组织切片、贴壁细胞或细胞涂片：在样品上滴加TUNEL检测液，37℃避光孵育60分钟。PBS或HBSS洗涤2-3次。用抗荧光衰减封片剂封片后，在荧光显微镜下观察。可以使用的激发波长范围为450-500nm，发射波长范围为515-565nm(绿色荧光)。

悬浮细胞：用TUNEL检测液重悬细胞，37℃避光孵育60分钟。PBS或HBSS洗涤2次。用250-500μl PBS或HBSS重悬细胞。用流式细胞仪分析细胞或者涂片后在荧光显微镜下观察。可以使用的激发波长范围为450-500nm，发射波长范围为515-565nm(绿色荧光)。

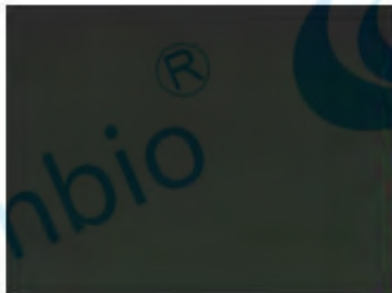
实验数据:

对照实验: Apoptosis Activator 2 — 200× 荧光显微镜

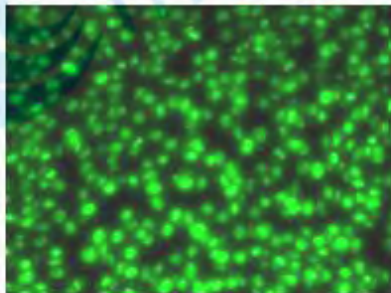


检测结果:

Control

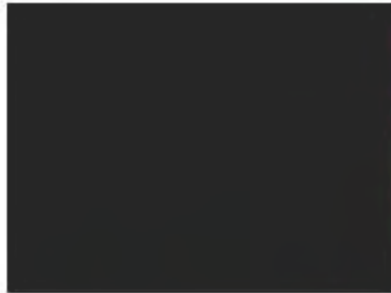


Apoptosis Activator 2

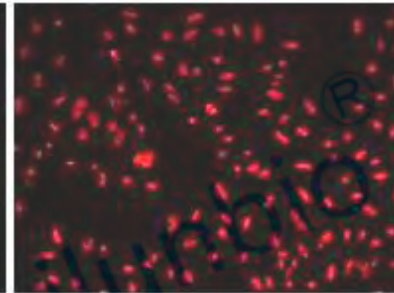


C6

Control



Apoptosis Activator 2



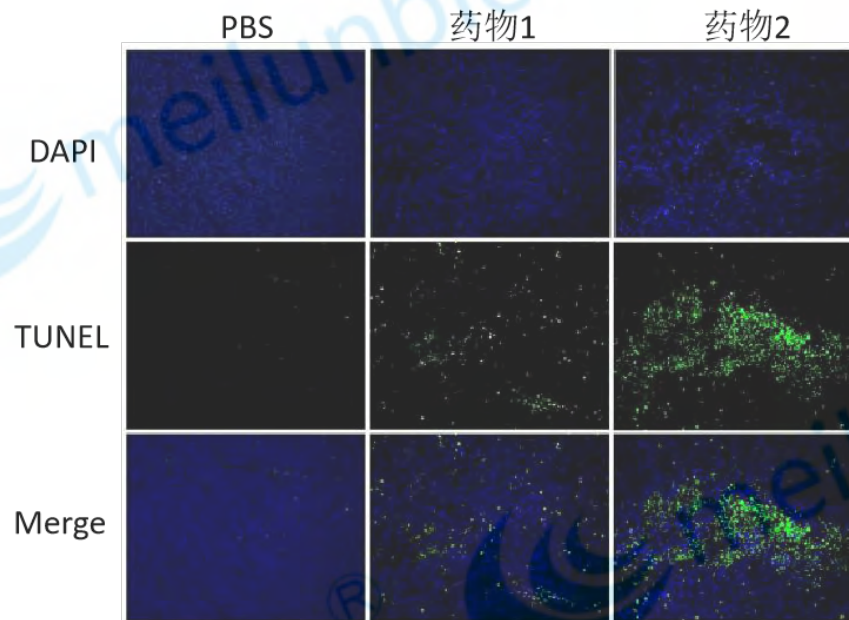
Hela

实验数据:

组织切片凋亡检测（肿瘤组织）—— 40× 荧光显微镜



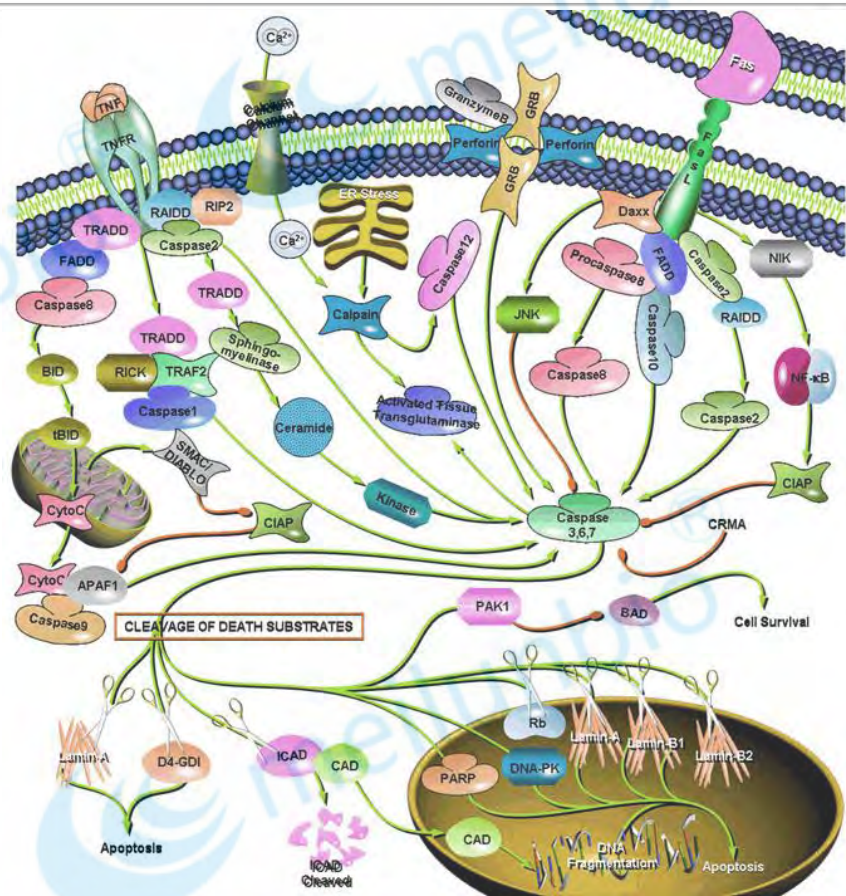
检测结果:



4. Caspase活性检测

Caspase (cysteiny-l-aspartic acid proteases)

是一组含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶，负责特异性切割靶蛋白天冬氨酸残基上的肽键，从而造成细胞凋亡。在正常的细胞中，每一种Caspase都是以非活性状态存在的，这些非活性的Caspase称作酶原 (Zymogen)，其肽链比有活性时长一些，将多出的部分切除，就转变为有活性的Caspase。多种因素会激活Caspase活性，一旦一个Caspase被激活，就会激活一系列其他的Caspase，裂解相应的胞浆胞核底物，最终导致细胞凋亡。Caspase的活化是细胞凋亡的典型特征。

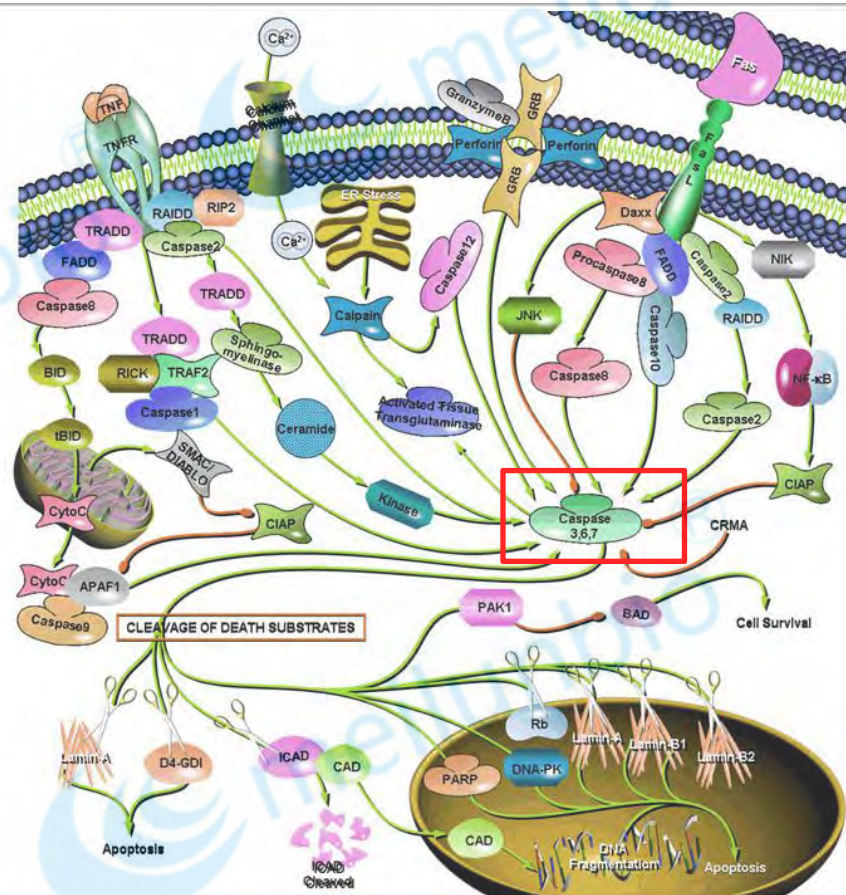


炎症组

Caspase-1
Caspase-4
Caspase-5
Caspase-11
Caspase-12
Caspase-13
Caspase-14

Caspase-2
Caspase-8
Caspase-9
Caspase-10

Caspase-3
Caspase-6
Caspase-7



A

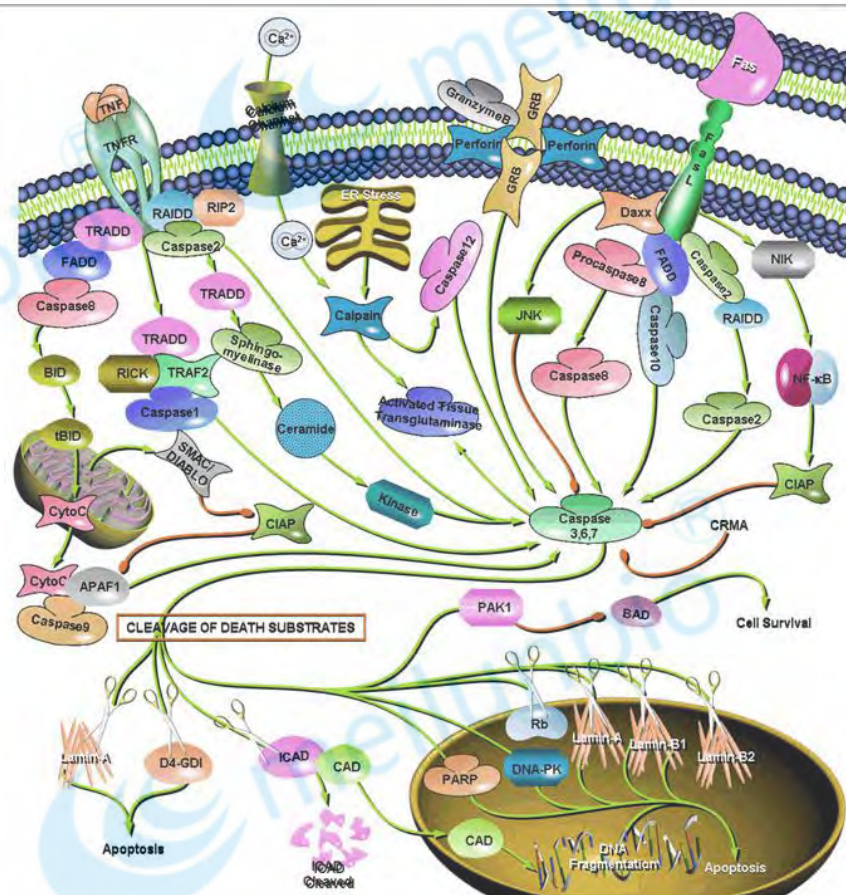
细胞外途径
(细胞表面死亡受体途径)

B

细胞内途径
(线粒体引发途径)

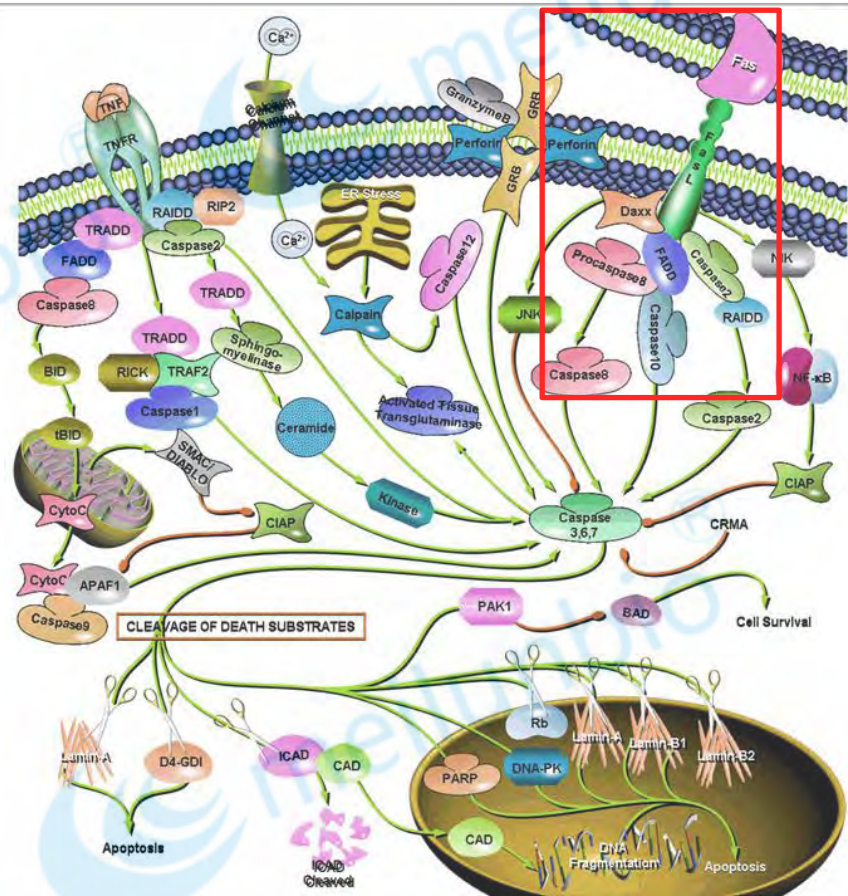
C

内质网介导的凋亡通路



细胞外途径：

细胞死亡信号蛋白盘绕粘附到它的同源细胞表面接收器上，死亡配体与其受体结合，导致其死亡结构域相互积聚，并与转接器分子的死亡结构域相互结合，使死亡受体分子活化。导致细胞内pro-caspase-8局部聚集，FADD与募集的pro-caspase-8的DED(即长原域中包含的死亡效应域)结合形成信号复合物，使pro-caspase-8自我水解、活化，形成活性caspase-8。激活的caspase-8激活下游caspase，引起细胞凋亡。

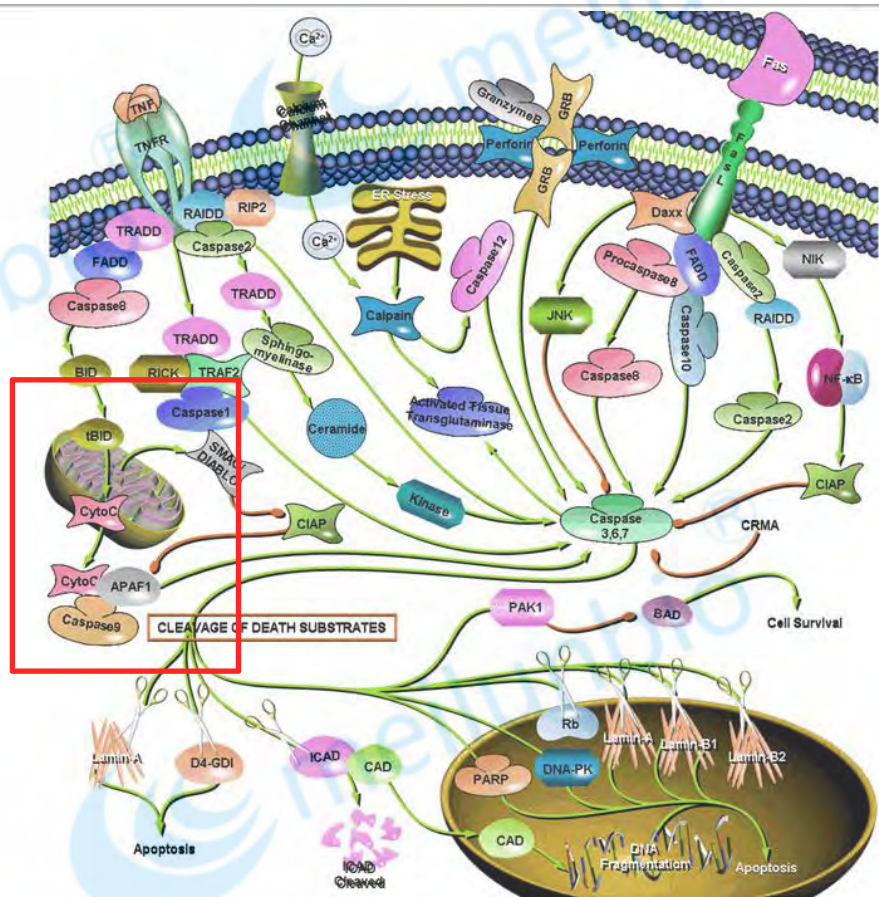


细胞内途径:

由线粒体介导的内源性凋亡通路是哺乳动物细胞程序性死亡的主要途径。

凋亡刺激

- 死亡促进因子(DPF)的释放, 包括细胞色素C、凋亡诱导因子(AIF)、促死亡蛋白
- dATP、ATP存在下活化caspase
- 细胞凋亡。



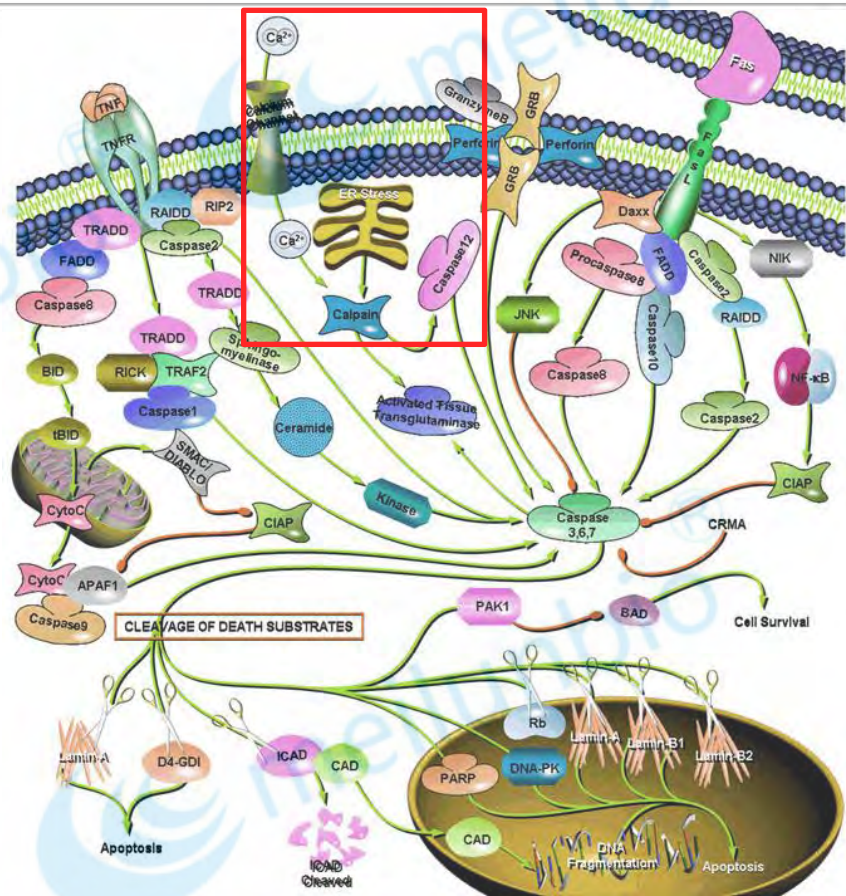
内质网介导的凋亡通路：

内质网钙离子内环境紊乱以及过量内质网蛋白积累能够激活位于内质网上的Caspase-12；

同时胞质中的Caspase-7 转移到内质网表面，进一步激活Caspase-12；

激活的Caspase-12 可进一步剪切Caspase-3；

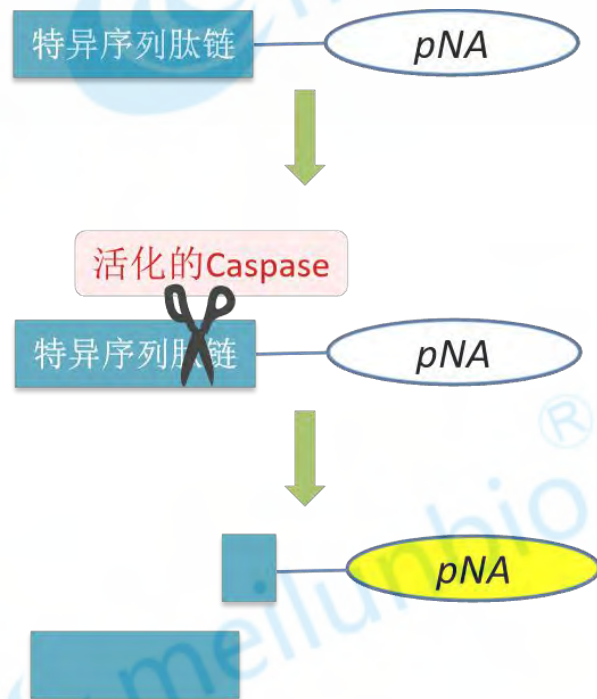
从而引发细胞凋亡。



检测原理：

每一种caspase都可以剪切特定的肽段序列，在相应的特异性肽链上偶联发色基团pNA(p-nitroaniline)即为活化的caspase的底物。

在活化的caspase存在的条件下，该底物被剪切，黄色基团pNA游离出来，产生的pNA越多，则溶液越黄，说明caspase的活性越高。通过酶标仪或分光光度计（ $\lambda=405\text{nm}$ ）测定其吸光度，便可检测凋亡细胞中的caspase活性及筛选caspases的激活剂或抑制剂。



● 不同Caspase识别肽段序列

蛋白酶	别名	识别序列	底物
caspase 1	ICE	YVAD	pro-IL-1b , pro-caspase 3, pro-caspase 4
caspase 2	ICH-1	VDQQD	PARP
caspase 3	CPP32, Yama, apopain	DEVD	PARP, DNA-PK, SRE/BP, rho-GDI, KCq
caspase 4	TX, ICH-2, ICErel-II	LEVD	pro-caspase 1
caspase 6	Mch2	VEID	lamin A
caspase 7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	DEVD	PARP, pro-caspase 6
caspase 8	MACH, FLICE, Mch5	IETD	pro-caspase3,4,7,9,10
caspase 9	ICE-LAP6, Mch6	LEHD	PARP

● 操作方法

- 自备试剂：PBS、Bradford法蛋白定量试剂
- 检测仪器：



1. 准备工作:

- a. 裂解液溶解后混匀并置于冰浴上备用。
- b. 检测缓冲液溶解后混匀并置于冰浴上备用。

2. 测定pNA标准曲线:

- a. 标准品稀释液的配制: 按照每0.9ml检测缓冲液加入0.1ml裂解液的比例配制适量的标准品稀释液。
- b. 把试剂盒提供的pNA (10mM)用标准品稀释液稀释为0、10、20、50、100和200 μ M, 作为标准品。
- c. 每个浓度取100 μ l用酶标仪进行检测, 或取适当量用容量不超过100 μ l的分光光度检测杯进行检测, 测定A405。
- d. 每一个标准品的A405减去不含pNA的空白对照的A405计算出实际的因pNA而导致的吸光度, 并制作出pNA浓度相对于A405的标准曲线。pNA标准曲线可以参考图1, 在0-200 μ M范围内存在良好的线性关系。

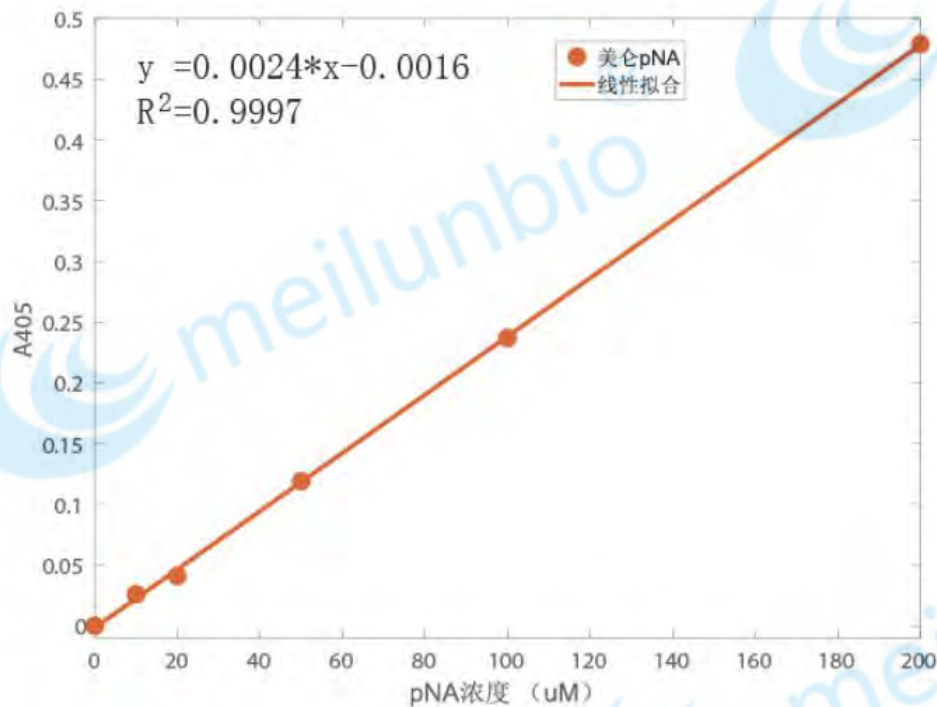


图. pNA标准曲线。实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

3. 样品的收集:

- a. **对于悬浮细胞:** 把没有诱导凋亡的对照样品和诱导凋亡的样品, 600g 4°C离心5分钟收集细胞, 小心吸除上清, 同时确保尽量没有细胞被吸除, PBS洗涤一次。同前吸尽上清后, 按照每200万细胞加入100微升裂解液的比例加入裂解液, 重悬沉淀, 冰浴裂解15分钟。下转步骤3d。
- b. **对于贴壁细胞:** 吸取细胞培养液, 备用。用胰酶消化贴壁细胞, 并收集至备用的细胞培养液中。600g 4°C离心5分钟收集细胞, 小心吸除上清, 同时确保尽量没有细胞被吸除, PBS洗涤一次。同前吸尽上清后, 按照每200万细胞加入100微升裂解液的比例加入裂解液, 重悬沉淀, 冰浴裂解15分钟。下转步骤3d。
- c. **对于组织样品:** 按照每3-10mg组织加入100微升裂解液的比例加入裂解液, 在冰浴上用玻璃匀浆器匀浆。然后把匀浆液转移到1.5ml离心管中, 冰浴再裂解5分钟。
- d. 4°C 16,000-20,000g离心10-15分钟。
- e. 把上清转移到冰浴预冷的离心管中。
- f. 立即测定caspase 3/7的酶活性或-80°C保存样品。同时可以取少量样品用Bradford法测定蛋白浓度, 尽量使蛋白浓度达到1-3mg/ml, 相当于每10微升待测样品中至少含有10-30μg蛋白。如果细胞较少, 可以适当增加细胞的用量。

4. Caspase 酶活性的检测:

	空白对照	样品
检测缓冲液	40 μ l	40 μ l
待测样品	0 μ l	50 μ l
裂解液	50 μ l	0 μ l
Ac- 肽链 -pNA (2mM)	10 μ l	10 μ l
总体积	100 μ l	100 μ l

37°C孵育60-120分钟。发现颜色变化比较明显时即可测定A405。如果颜色变化不明显，可以适当延长孵育时间，甚至可以孵育过夜。

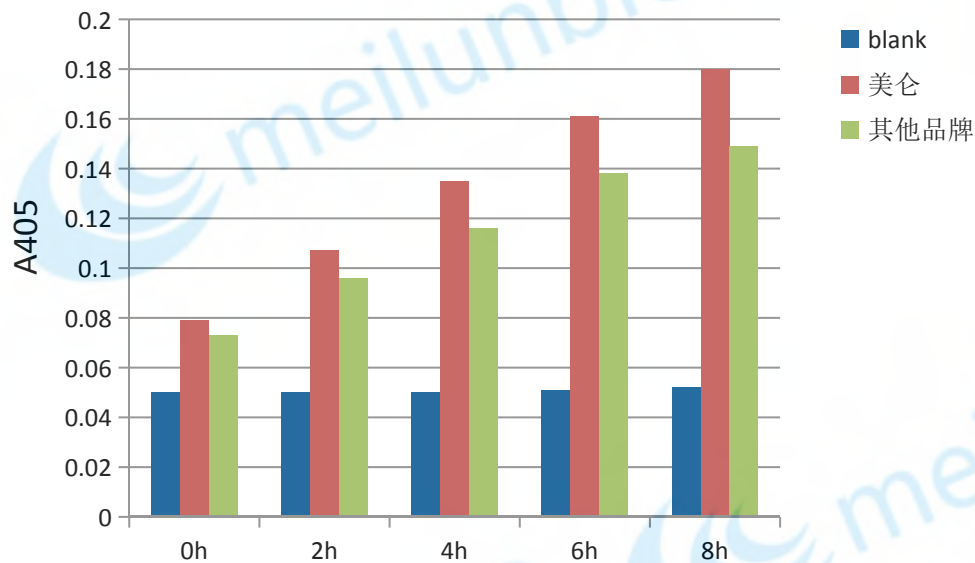
d. 样品的A405扣除空白对照的A405，即为样品中caspase 3/7催化产生的pNA产生的吸光度。通过同步骤1中获得的标准曲线对比就可以计算出样品中催化产生了多少量的pNA。

4. Caspase 酶活性的检测:

- 一个酶活力单位定义为当底物饱和时，在37°C一个小时内可以剪切1nmol Ac-肽链-pNA产生1nmol pNA的caspase的酶量。这样就可以计算出样品中含有多少个酶活力单位的caspase 3/7。
- 用Bradford法检测待测样品中的蛋白浓度。这样就可以计算出一个样品单位重量蛋白中所含的caspase 3/7的酶活力单位。

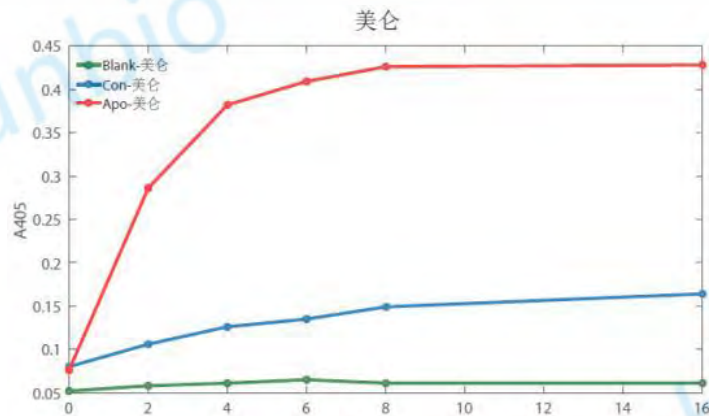
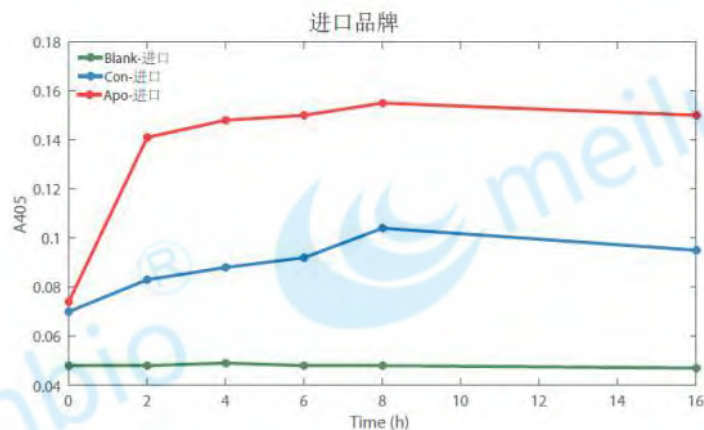
● 实验结果（以Caspase3活性检测试剂盒为例）

Caspase3 活性检测 in c6 cell-lysates with 2mg/ml



● 实验结果（以Caspase3活性检测试剂盒为例）

HL-60细胞Caspase3活性检测



5. 荧光标记细胞形态检测

细胞形态的变化可作为细胞凋亡的证据，如：胞膜皱褶或出泡、核染色质致密、胞质浓缩、嗜酸性染色增强、可形成凋亡小体等。一般以细胞核染色质的形态学改变为指标来评判细胞凋亡的进展情况。

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；II a期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化；II b期的细胞核裂解为碎块，产生凋亡小体。

标记细胞核常用的DNA特异性荧光染料有：**Hoechst 33342、Hoechst 33258、DAPI**等。

★ Hoechst 33342、Hoechst 33258、DAPI 的比较

相同点：

- 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。

不同点：

- Hoechst 具有膜通透性，能进入正常细胞膜而对活细胞没有太大细胞毒作用；DAPI 为膜半通透性，用于固定细胞的染色。
- Hoechst 33342 比 33258 更容易透过细胞膜，所以常用 33342 染死活细胞，33258 染死细胞。而有些种类的细胞由于可以更有效地将进入细胞的 Hoechst 染料主动转运到细胞外，所以染色会弱一些，这时一般也选择 Hoechst 33342。

- 细胞核荧光染色自备试剂：**PBS**、抗荧光衰减封片剂
- 检测仪器：



➤ 细胞凋亡与坏死检测 (Meilunbio®货号 : MA0335)

凋亡与坏死检测试剂盒采用Hoechst 33342和碘化丙啶 (Propidium Iodide , PI) 双染的方法，检测细胞凋亡与坏死。PI、Hoechst 33342均可与细胞核DNA (或RNA) 结合。但是PI不能通过正常细胞的细胞膜，Hoechst 33342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，这时可被PI着红色荧光。正常细胞和中早期凋亡细胞均可被Hoechst 33342着色，但是正常细胞核的Hoechst 33342着色的形态呈圆形，淡蓝色荧光，内有较深的蓝色颗粒；而凋亡细胞的核由于浓集而呈亮蓝色荧光，或核呈分叶，碎片状，边集。

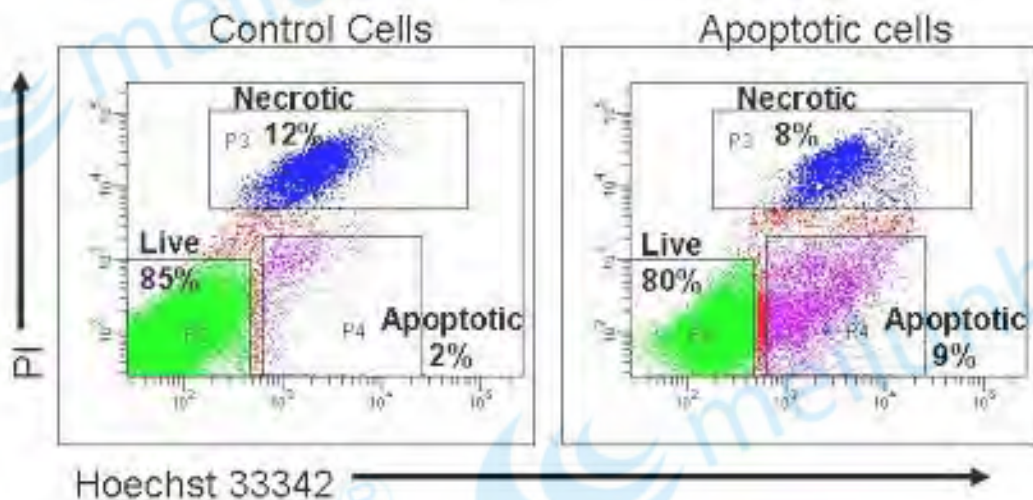
这两种染料对细胞进行双染后，使用流式细胞仪或荧光显微镜即可对细胞状态进行检测：**正常细胞为弱红色荧光/弱蓝色荧光 (PI+/Hoechst+)**，**凋亡细胞为弱红色荧光/强蓝色荧光 (PI+/Hoechst++)**，**坏死细胞为强红色荧光 + 弱蓝色荧光 (PI++/Hoechst+)**。

操作方法：

1. 每个样品收集约 10^5 - 10^6 个细胞于 1.5ml 离心管内，离心弃上清。细胞沉淀用 0.8-1ml 细胞染色缓冲液重悬。
2. 加入 5 μ l Hoechst 染色液(1mg/ml)。加入 5 μ l PI 染色液(1mg/ml)。【请根据具体实验进行适当稀释。】
4. 混匀，冰浴或 4℃ 孵育 20-30 分钟。
5. 用流式细胞仪检测红色荧光和蓝色荧光。Hoechst33342 激发波长为 352nm，发射波长为 400-500nm，产生蓝色荧光；PI 用氩离子激光激发荧光，激发光波波长为 488nm，发射光波波长大于 630nm，产生红色荧光。
6. 如果使用荧光显微镜检测，检测前离心沉淀细胞，用 PBS 洗涤一次，再涂片观察红色荧光和蓝色荧光。对于贴壁细胞使用荧光显微镜检测，可以不收集细胞，直接依次加入细胞染色缓冲液、Hoechst 染色液和 PI 染色液冰浴或 4℃ 染色 20-30 分钟。染色后 PBS 洗涤一次，再在荧光显微镜下观察。

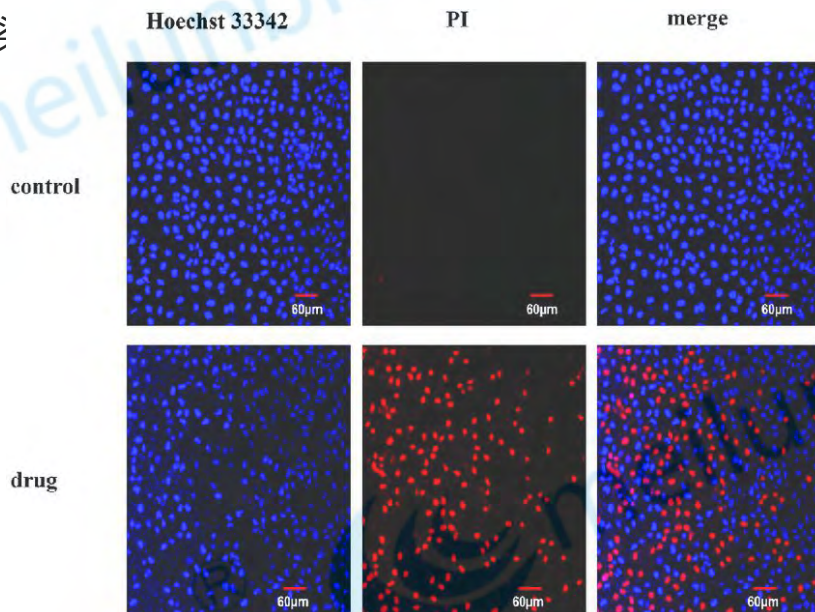
染色结果：

(1) 流式细胞仪分析：在蓝色荧光对红色荧光的散点图上：正常细胞为弱红色荧光/弱蓝色荧光 (PI+/Hoechst+)，凋亡细胞为弱红色荧光/强蓝色荧光 (PI+/Hoechst++)，坏死细胞为强红色荧光 + 弱蓝色荧光 (PI++/Hoechst+)。



染色结果：

(2) 荧光显微镜观察：在荧光显微镜下可见 4 种细胞形态：正常细胞，核染成淡蓝色，呈正常结构；早期凋亡细胞，核染成亮蓝色，呈固缩状或圆珠状；晚期凋亡细胞，核染成红色，同时呈亮蓝色，可见明显的染色质凝集；非凋亡的坏死细胞，核

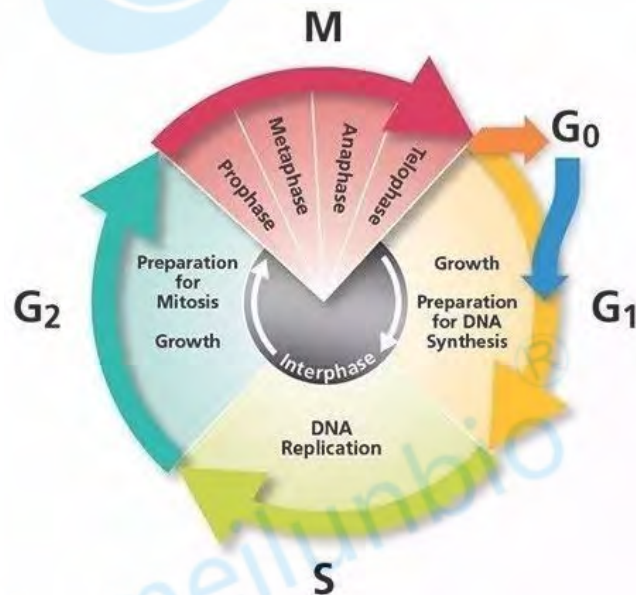


➤ 细胞周期与细胞凋亡检测

(Meilunbio®货号：MA0334)

采用经典的碘化丙啶染色 (PI staining) 方法，通过流式细胞仪分析对细胞周期与细胞凋亡进行检测。

细胞周期分为间期与分裂期 (M期) 两个阶段，间期又分为：休眠期 (G₀)、DNA合成前期 (G₁期)、DNA合成期 (S期) 与DNA合成后期 (G₂期)。利用细胞内DNA能够和荧光染料 (如PI) 结合的特性，细胞各个时期其DNA含量不同从而结合的荧光染料不同，检测到的荧光强度也不一样，从而反应出细胞周期的各个期的状况。



➤ 细胞周期与细胞凋亡检测 (Meilunbio®货号 : MA0334)

凋亡细胞由于细胞核发生浓缩以及发生DNA片段化导致部分基因组DNA片段在染色过程中丢失，因此凋亡细胞碘化丙啶染色后呈现明显的弱染，即荧光强度小于1，在流式检测的荧光图上出现所谓的sub-G1峰，即凋亡细胞峰。PI染色还可以区分细胞凋亡和细胞坏死的细胞峰型。细胞凋亡时，出现凋亡细胞皱缩、染色质浓缩、核碎裂，产生凋亡小体，使细胞的前向角光散射 (FSC) 低于正常。在细胞凋亡的早期，细胞对前向角光散射 (FSC) 的能力显著降低，对侧向角光散射 (SSC) 的能力增加或没有变化。在细胞凋亡的晚期，FSC和SSC的信号均降低。细胞坏死时细胞多表现为细胞肿胀，因此FSC高于正常，SSC高于正常。

➤ 细胞周期与细胞凋亡检测 (Meilunbio®货号 : MA0334)

- 细胞周期检测自备试剂：胰酶、**PBS**、无水乙醇（预冷）
- 所需仪器与工具：流式细胞仪、离心机、水浴、锡箔纸



细胞周期检测步骤：

一、细胞收集：

1. a. 对于贴壁细胞：收集细胞培养液至离心管内备用。常规方法用胰酶消化细胞，用之前收集的细胞培养液终止消化，并轻轻吹散细胞，收集至离心管内。【注意：消化后的吹打需轻柔，避免细胞破碎】
b. 对于悬浮细胞：小心吸取所有含有细胞的培养基至离心管内。
2. 将以上收集的细胞 1000g 左右离心 3-5min，沉淀细胞。【若细胞沉淀不充分，可以适当延长离心时间或稍加大离心力】小心吸弃上清，残留约 50 μ l，以免吸走细胞。
3. 加入 1ml 预冷的 PBS，重悬细胞，并转移至 1.5ml 离心管内。再次 1000g 左右离心 3- 5min，沉淀细胞，小心吸弃上清，残留约 50 μ l，以免吸走细胞。轻轻弹击离心管底，以适当分散细胞，避免细胞成团。

细胞周期检测步骤：

二、细胞固定：

1. 加入 1ml PBS 充分重悬，成单细胞，轻轻边涡旋边缓慢滴加 3ml 预冷的无水乙醇，至终浓度 75%，4℃固定 4h 以上，或者 4℃静置过夜（18-24h）效果更佳。【固定后的细胞可以-20℃保存一个月】
2. 将固定好的细胞悬液 1000g 左右离心 3-5min，沉淀细胞。【若细胞沉淀不充分，可以适当延长离心时间或稍加大离心力】小心吸弃上清，残留约 50μl，以免吸走细胞。
3. 加入 1ml 预冷的 PBS，重悬细胞，再次 1000g 左右离心 3-5min 沉淀细胞，小心吸除上清，残留约 50μl，以免吸走细胞。轻轻弹击离心管底，以适当分散细胞，避免细胞成团。

细胞周期检测步骤：

三、染色工作液的配制：

按照染色缓冲液：碘化丙啶 PI 染色液(20X)：RNase A(50X)=100:5:2 的比例混合配置成染色工作液，请参考下表，根据样品数量选择合适的工作液体积：

	1 个样品	n 个样品
染色缓冲液	500 μ l	500×n μ l
碘化丙啶 PI 染色液(20X)	25 μ l	25×n μ l
RNase A(50X)	10 μ l	10×n μ l
总体积	535 μ l	535×n μ l

【注意：配制好的染色工作液短时间内可以 4℃保存，宜当天使用。】

细胞周期检测步骤：

四、染色：

每管细胞样品加入500 μ l染色工作液，轻柔并充分重悬细胞沉淀，37 $^{\circ}$ C避光温浴30min。染色完成后置于4 $^{\circ}$ C避光存放，宜在24h内完成流式上机检测。

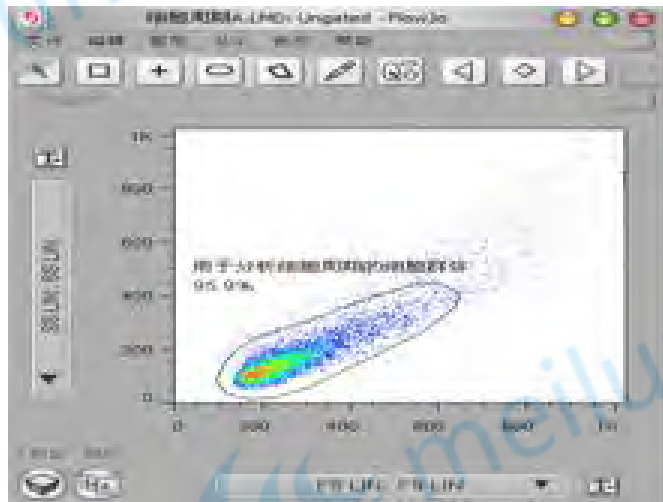
五、流式检测和分析：

用流式细胞仪在激发波长488nm波长处检测红色荧光，同时检测光散射情况。采用适当分析软件进行细胞DNA含量分析和光散射分析。



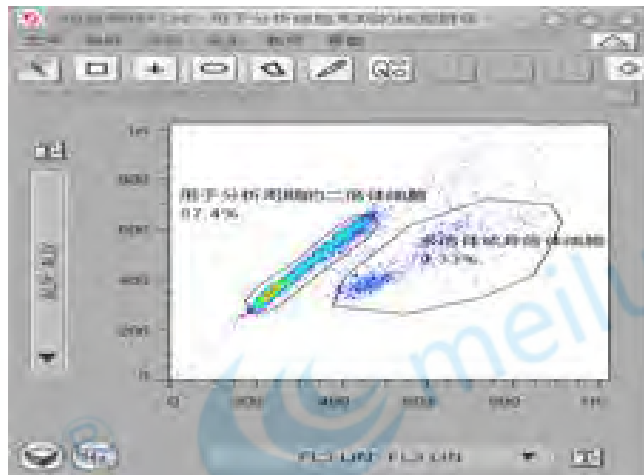
FlowJo分析细胞周期数据：

1. 把细胞周期样品拖入FlowJo软件，双击打开原始数据。X轴选择FSC,Y轴选择SSC。分析细胞周期的细胞选择上图所示的细胞群体进行分析。



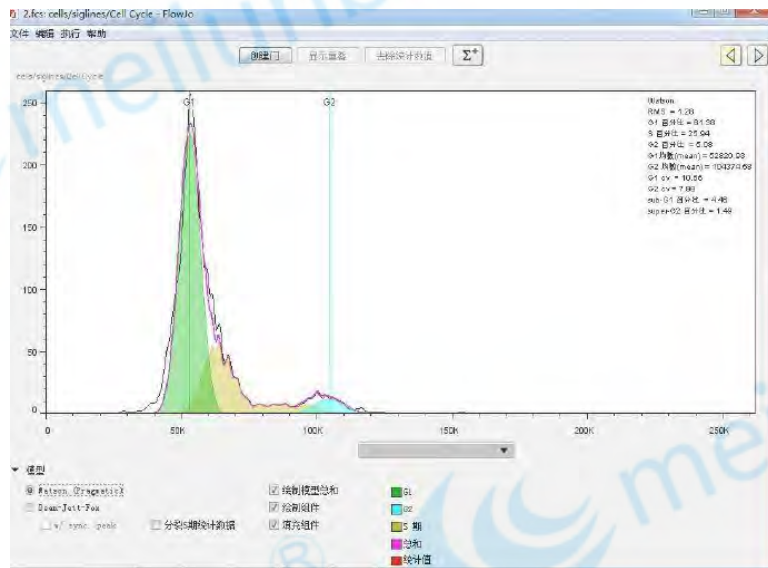
FlowJo分析细胞周期数据：

2. 在SSC/FSC图中双击分析的细胞群体。X轴选择FL3-LIN,用来表示PI的线性信号。Y轴选择FL3-PEAK,用来表示PI的峰值信号。本实验数据采集采用的是贝克曼仪器采集的数据。（如果是BD的仪器采集的数据，X轴选择FL2-W,用来表示PI的宽度信号。Y轴选择FL2-A,用来表示PI的面积信号），如图所示多倍体或异倍体细胞不予分析。



FlowJo分析细胞周期数据：

3. 在FlowJo工作台中选中“用于周期分析的二倍体细胞”这个结点，在工具栏的“工具”中选择“细胞周期”。



FlowJo分析细胞周期数据：

说明：

- 1) 分析的模型有Watson和DJF两种，用户可以选择任意一种进行分析，两模型间没有实质的差别。模式右边是两种模型的显示方式。
- 2) 细胞周期拟合原则：G1峰限制和G2峰限制。根据实验结果拟合情况，对G1峰限制和G2峰限制进行适当的调整。

FlowJo分析细胞周期数据：

曲线调整原则：粉色的曲线为模型曲线，黑色的为样本曲线，理想状况是粉色和黑色曲线吻合一致为最佳。拟和的好坏可以根据右边的RMS值来判断。RMS(root mean square)值越小越好。但是这只是一个相对值，只在同样本不同模拟情况下，选取最小值来达到最佳拟和。你可以选中G1期的峰或G2期的峰，根据调节按钮调节峰的宽度

通常来说，G2的位置为G1的2倍。你可以根据相对固定的那个峰来确定另外一个峰的位置，如G1峰相对固定的话，就选择G2峰的均数为G1的2倍($2G1$)；如果G2峰相对固定的话，就选择G1峰为G2峰的0.5G2

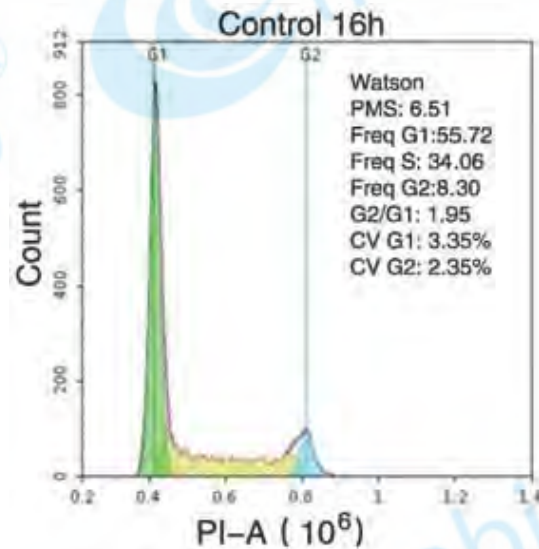
细胞周期结果分析：

G1期含义：细胞进行大量物质合成时期，为DNA合成做准备。

S期含义：开始至完成DNA的合成以及合成组蛋白。

G2/M期的含义：DNA复制结束和开始有丝分裂之间的间隙。

通常，根据G1期、S期、G2期的百分含量（**Freq G1**、**Freq S**、**Freq G2**）来判断细胞周期的变化。相对于正常的细胞，加药或者照射的细胞的周期可能会发生变。一般根据S+G2期的百分含量判断处理后的细胞是促进增殖还是抑制增殖。



什么样的数据可以用？

G2/M期细胞的DNA含量是G1期的2倍，在直方图上形成一个2倍于G1信号峰的高斯峰，**G2/G1**越接近2越好；

CV(变异系数)表示峰的宽度，CV值越小，峰形越好，最好是在5%左右，一般小于10%也被认可。

RMS(root mean square)值越小越好。但是这只是一个相对值，只在同样本不同模拟情况下，选取最小值来达到最佳拟和。

