



# 细胞凋亡的免疫检测技术

(Apoptosis immunoassay technique)

## 一、概述

细胞凋亡 (apoptosis, Apo) 是细胞增殖的反面，探讨的是细胞死亡的方式与机制。凋亡一词来源于希腊语。原指花瓣、叶片的脱落。自 1972 年 Kerr 首次提出细胞凋亡的概念以来，随着细胞生物学、免疫学和肿瘤学的研究发展，最近几年人们对细胞凋亡的重大理论意义和实际意义有了更深的理解。细胞凋亡是指在一定的生理和病理情况下，机体为维护内环境的稳定，通过基因调控而使细胞自动消亡的过程。不同类型的细胞，在发生凋亡时的动力学过程也不一致，存在着一定的形态学和生物化学的差异，但若干基本变化是大同小异的。其特征为：整个胞体呈浓缩状，有特异性胞浆大泡，胞质、核质深染，核碎裂后被细胞膜包裹而形成凋亡小体 (apoptosis body)。它有别于细胞死亡 (necrosis, Nec)。在琼脂糖凝胶电泳上显示出特殊的 DNA 梯状图谱。它的出现主要是由于一种钙-镁依赖性核酸内切酶激活后，裂解染色质核小体 (nucleosome) 之间的连接 DNA，将核小体切割成 180bp~200bp 或其倍数的片段所致。Apo 是不可逆的过程，散在分布于组织中，形成的凋亡小体，除核裂解外，外有膜包绕，内有完整的细胞器，凋亡小体在组织中很快被邻近组织细胞吞噬，并在溶酶体中被降解。因此，Apo 不引起周围组织炎症及损伤。Apo 是机体自己启动，由细胞本身主动控制，由基因指导的细胞自我消亡过程。因此，又称程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD)。

光镜下，Apo 的典型形态学特征是核染色质广泛凝聚，细胞体积缩小，胞质浓缩，有凋亡小体存在，细胞表面特化结构如微绒毛等丢失及细胞表面明显的迂曲。体内细胞凋亡过程发展非常迅速，细胞常在数小时内完成 Apo 并降解，凋亡细胞仅出现数分钟就消失，故不适宜应用形态学方法 (普通光学显微镜检测法、荧光显微镜检测法、凋亡小体的电镜观察及凋亡指数和细胞活力的定量测定) 来检测。在生物化学方面，利用电泳技术证明核体断片的“DNA 梯状图谱”作为检测群体细胞发生凋亡的一个指标。经过人们多年的研究发现，应用原位末端转移酶标记技术 (TDT assay or TUNEL reaction) 来检测细胞凋亡，其灵敏度高，特异性强，能早期显示未发生典型变化的凋亡细胞。它是检测单个细胞早期出现凋亡现象的好方法。近几年，人们又发现了能更快、更敏感、检测细胞数量更多的并能从更多方面证明凋亡和坏死的流式细胞分析术 (flow cytometry, FCM 包括亚“G1”峰检测法和末端转移酶标记技术) 等。本章仅介绍免疫学检测方法。



## 二、ELISA 法

### （一）原理

细胞凋亡的发生，是由于钙-镁依赖性核酸酶进入核小体间切割 DNA, 产生 180bp~200bp 或其倍数的核小体片段。而核小体由于与组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 形成紧密复合物而不被核酸内切酶切割。采用双抗体夹心酶免疫法，应用小鼠抗 DNA 和抗组蛋白的单克隆抗体，与核小体片段形成夹心结构，可特异性检测细胞溶解物中的核小体片段。

### （二）材料与试剂

1. 采用 Boehringer Mannheim 公司试剂盒，生物标记的小鼠抗组蛋白单克隆抗体。
2. 过氧化物酶（-POD）标记的小鼠抗 DNA 单克隆抗体
3. 链霉亲和素包被的微孔板
4. DNA-组蛋白复合物，作为阴性对照。
5. ABTS 底物
6. 溶解缓冲液
7. 温育缓冲液
8. 底物缓冲液

### （三）样品

1. 培养细胞或离体细胞的裂解物 细胞裂解步骤：收集细胞，离心后，用 200 $\mu$ l 溶细胞缓冲液重新悬浮，室温下作用 30min。
2. 培养细胞的上清液
3. 血浆（血清）

### （四）操作方法

1. 取样品离心后（1 000r/min, 10min），吸取 20 $\mu$ l 上清液，加入链霉亲和素包被的培养板孔中。
2. 另加入 80 $\mu$ l 免疫反应试剂 含抗-DNA-POD、抗组蛋白-生物素及温育缓冲液（按 1：1：18 混合），室温下孵育 2h（置摇床上，250r/min）。
3. 取上清，用 300 $\mu$ l 温育缓冲液洗涤 3 次，小心移去洗涤液。
4. 加入 100 $\mu$ l 底物缓冲液，室温下孵育使颜色变化至适合（置摇床上）。
5. 尽快作比色分析（10min~20min 内），用底物缓冲液作空白对照，以波长 405nm，参考波长 492nm 进行检测。

### （五）结果判定

按下列公式计算细胞释放的单/低聚核小体片段的特别聚集值：

$$\text{聚集值} = \frac{\text{样品的 mU (诱导凋亡处理的细胞)}}{\text{对照的 mU (未经诱导凋亡处理的细胞)}}$$

注：mU=吸收值 ( $10^{-3}$ ) = 双孔吸收值的平均OD值 - 底物OD值，若样品的吸收值超过比色测定范围，应适当稀释后再检测。

### 三、原位末端转移酶标记技术

#### (一) 原理

凋亡细胞是由于内源性核酸内切酶的激活后，将 DNA 切割成许多双链 DNA 片段以及高分子量 DNA 单链断裂点（缺口），暴露出大量 3-羟基末端，如用末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）将标记的 dUTP 进行缺口末端标记，则可原位特异地显示出凋亡细胞。主要应用的是荧光标记法和酶标记法。

#### (二) 荧光标记法

1. 材料与试剂 采用德国Boehringer-Mannheim公司In Situ Cell Death Detection 试剂盒，或美国Oncor公司ApopTag™试剂盒，包括：

- (1) 生物素标记的-dUtp (Biotin-dUTP) 或地高辛标记的-dUTP (Digoxigenin-dUTP) 1 nmol/ $\mu$ l
- (2) TdT 酶 (25U/ $\mu$ l)
- (3) 反应缓冲液
- (4) 洗涤缓冲液
- (5) 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的亲合素或链霉亲合素 (2.5 $\mu$ g/ml) 或抗地高辛抗体 (1:30)
- (6) PI 染液 (含 PI 5 $\mu$ g/ml 及无 DNA 酶活性的 RNA 酶 0.1%)
- (7) PBS 缓冲液
- (8) 塑料盖玻片

#### 2. 样品

- (1) 悬浮生长培养细胞的甩片或涂片
- (2) 贴壁生长的培养细胞
- (3) 冰冻切片
- (4) 常规石蜡切片

#### 3. 操作方法

(1) 固定：培养细胞的制片或冰冻切片用 4%多聚甲醛固定 30min(4℃)后，用 80%酒精再固定 2h (-20℃)。常规 4%中性福尔马林固定、石蜡包埋之切片进行脱蜡、水化。

(2) 洗涤：玻片浸入 PBS 缓冲液，摇床上洗涤 5min，三次。

(3) 反应：洗涤后的玻片用吸水纸吸干细胞或组织周围水分，按 50  $\mu$ l/ $\text{cm}^2$ 滴加反应液（每 50

$\mu$  l 反应液含 TdT 酶 0.5  $\mu$  l, 标记的-dUTP 1  $\mu$  l), 使反应液均匀地覆盖于所有细胞或组织切片上, 盖上塑料盖玻片, 置湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

(4) 终止反应: 去掉塑料盖玻片, 将玻片置盛有洗涤缓冲液的染色缸内, 洗涤两次, 每次 5min。

(5) FITC 标记: 洗涤后的玻片用吸水纸吸去细胞或组织周围水分, 按 50  $\mu$  l/cm<sup>2</sup> 滴加 FITC 反应液 (含 FITC 2.5  $\mu$  g/ml), 室温下避光孵育 10min。

(6) 洗涤: 将玻片置于洗涤缓冲液内, 洗两次, 每次 5min。

(7) PI 复染: 将玻片置于盛有 PI 染液的染色缸内, 室温下避光染色 30min。

(8) 封片: 用盖玻片直接盖在含 PI 染液的玻片上, 亦可用无色指甲油涂于盖玻片四周边缘, 置暗盒中, 尽早镜检观察。

4. 结果判定: 用荧光显微镜观察, 选用蓝色激发光 (波长 488nm), 所有的细胞核均被 PI 着色, 显示出红色荧光, 而凋亡细胞被特异地标记上 FITC, 显示出黄绿色荧光。

### (三) 酶标记法

1. 材料与试剂 采用美国 Oncor 公司 ApopTag<sup>TM</sup>-Peroxidase 试剂盒, 包括:

(1) 过氧化物酶标记的抗地高辛抗体

(2) 反应缓冲液

(3) TdT 酶

(4) 反应终止/洗涤液

(5) 平衡缓冲液

(6) 蛋白酶 K 消化液: 20  $\mu$  g/ml 蛋白酶 K 溶于 PBS。

(7) 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(8) DAB 显色液: 0.05% 的 diaminobenzidine (DAB) 溶于 PBS, 用前过滤并加入 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

(9) 甲基绿染液: 0.5% 甲基绿溶于 0.1Mol/L 枸橼酸钠, pH 调整到 4.0。

(10) 塑料盖玻片及玻璃盖玻片

2. 样品 同荧光标记法。

3. 操作方法

(1) 固定: 同荧光标记法。

(2) 内源性过氧化物封闭 玻片置于盛有 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 缓冲溶液的染色缸内, 室温下作用 20min 后, 同荧光标记法洗涤。

(3) 消化: 玻片浸于盛有蛋白酶 K 消化液的染色缸, 室温下消化 15min, 洗涤同上。

(4) 平衡处理: 将细胞或组织周围液体用吸水纸吸干, 滴加平衡缓冲液 (按 70  $\mu$ l / cm<sup>2</sup>) 覆盖细

胞或组织表面，盖上塑料盖玻片，室温下作用 5min~10min。

(5) 反应：移去盖玻片，倾去平衡液，用吸水纸吸干周围液体，滴加反应液（按  $50\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ， $18\mu\text{l}$  TdT酶+ $36\mu\text{l}$  反应缓冲液），均匀覆盖在细胞或组织上，盖上塑料盖玻片，置于湿盒中， $37^\circ\text{C}$  温育 1h。

(6) 终止反应：移去盖玻片，将玻片置于盛有终止/洗涤液的染色缸内， $37^\circ\text{C}$  下洗涤 30min（置摇床上振摇）。然后将玻片置于洗涤缓冲液内，洗两次，每次 5min。

(7) 地高辛抗体反应：用吸水纸吸干细胞或组织周围液体，滴加  $70\mu\text{l}$  过氧化物酶标记的地高辛抗体，均匀覆盖，加上塑料盖玻片，室温下置于湿盒中，孵育 30min。

(8) 洗涤：置于洗涤缓冲液内，洗两次，每次 5min。

(9) 用吸水纸吸干细胞或组织周围液体，滴加新鲜配制的 DAB 显色液，均匀覆盖，加上塑料盖玻片，室温下作用 3min~6min。

(10) 洗涤：置于蒸馏水中洗涤 3 次，每次 3min~6min。

(11) 套染：将玻片置于盛有甲基绿染液的染色缸中，室温染色 10min。

(12) 洗涤：蒸馏水洗涤 3 次（置于摇床上），每次 2min。

(13) 脱水、封片：100%正丁醇，3 次，每次 2min。二甲苯，3 次，每次 2min。

明胶甘油封片。

4. 结果判定 光学显微镜下观察，所有的细胞核均着绿色，凋亡的细胞核染色质显示出特异性的棕黄色。



## 上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：5446 0832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

