

## 水稻细胞凋亡定量检测-Comet assay

李兴旺, 张海涛, 吴昌银\*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

\*通讯作者邮箱: [cywu@mail.hzau.edu.cn](mailto:cywu@mail.hzau.edu.cn)

引用格式: 李兴旺, 张海涛, 吴昌银. (2018). 水稻细胞凋亡定量检测-Comet assay. *Bio-101*: e1010172. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010172.

**实验原理:** 与动物类似, 植物在受到一定的外界刺激和在特定的发育阶段, 特定类型的细胞会发生细胞程序性死亡(PCD), 该过程的显著特征之一是细胞核中的 DNA 会发生片段化。将经过变性处理的很多发生了 PCD 的单个细胞固定在低熔点琼脂糖凝胶中, 在普通的 DNA 电泳过程中, 片段化的 DNA 会被电泳出细胞, 这些细胞用灵敏的 DNA 荧光染料染色后, 会观察到一个圆形的细胞核带着一个 DNA 拖尾, 形状似“彗星”(comet), 所以这种基于单细胞电泳的方法也称 Comet assay。最后, 通过一个可以分别计算“彗星”头部和拖尾中的荧光强度(对应着 DNA 的量)的软件, 然后算出尾部 DNA(发生了片段化的 DNA)所占整个细胞核 DNA 的百分数, 该值即可定量的反映该细胞的 PCD 程度。

理论上, 水稻任何组织器官的细胞都可以做 PCD 的定量检测, 但要尽量保证细胞种类的一致性。本方法中所提到实例的实验材料是野生型水稻品种中花 11 (ZH11)和一个绒毡层细胞 PCD 过程受到抑制的水稻突变体(*osapi5-1*)的花药。

**实验目的:** 定量检测某处理下细胞的 DNA 片段化程度。

**关键词:** 细胞程序性死亡, Comet assay, 花药

### 材料与试剂

1. 离心管
2. 载玻片
3. 玻璃平皿 (5 cm 直径)
4. 尼龙滤膜 (Millipore, 孔径 100 nm)
5. 水稻突变体(*osapi5-1*)
6. 水稻品种中花 11

7. 冰
8. 低熔点琼脂糖
9. Comet Assay Reagent Kit (Trevigen, catalog number: 4250-050-K)
10. 1x PBS (Ca 离子和 Mg 离子 free, 非常重要)
11. 1.2% (w/v) NaOH
12. 1x TBE
13. 70%的乙醇
14. 1x TE
15. 甘油

注: 化学试剂全部购自 *sigma* 公司, 除了乙醇和甘油。

## 仪器设备

1. 冰箱
2. 手术刀
3. 普通水平 DNA 电泳设备
4. 荧光显微镜(Leica DM4000B with CCD camera Leica DFC480)

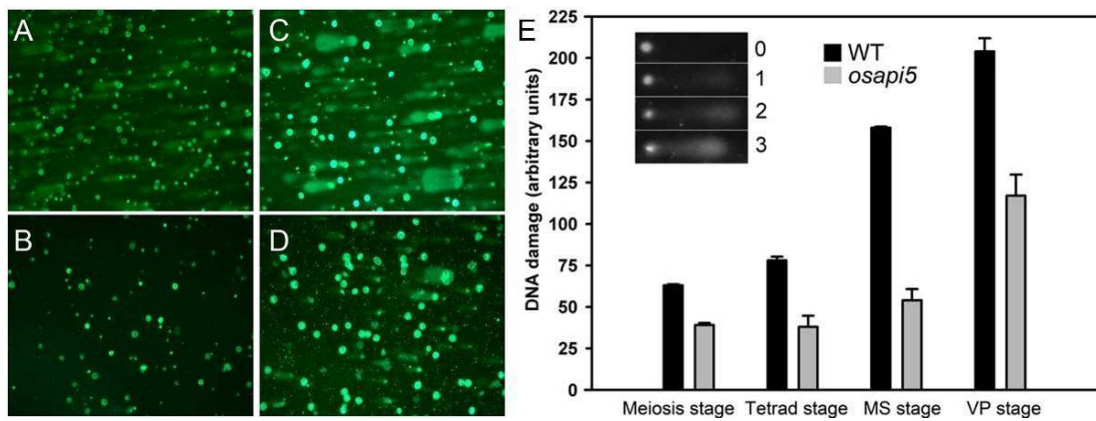
## 实验步骤

1. 取 1 ml 预冷的 1x PBS(含有 20 mM EDTA)于预先置冰上的玻璃平皿内, 分别取野生型和突变体的处于小孢子早期的 30 朵小花的花药置于 1x PBS 中 (至少设置 3 个生物学重复)。
2. 用手术刀将花药尽量切碎在 PBS 中, 制成细胞悬浮液 (该过程一直保持置冰上操作)。
3. 用尼龙滤膜过滤刚制好的细胞悬浮液, 收集滤液于用冰预冷的 1.5 ml 离心管内。
4. 取 30  $\mu$ l 的过滤液和 300  $\mu$ l 的 1%的低熔点琼脂糖 (37 °C 预热)混匀, 取 70  $\mu$ l 凝胶和样品的混合液点到处理过的载玻片上 (“Comet Assay Reagent Kit”试剂盒内提供), 每个载玻片上点 3 个点, 置 4 °C 冰箱内, 10 min, 使凝胶凝固。
5. 将凝固好的载玻片浸入用冰预冷的 Lysis buffer (试剂盒内提供), 4 °C 冰箱内放置 45 min。
6. 去除载玻片上多余的 Buffer, 将载玻片浸入新配的 1.2% (w/v) NaOH (含有 1 mM

- EDTA)中，室温处理 40 min。
7. 小心去掉多余的 NaOH 溶液，将载玻片浸入 1x TBE 中，放置 5 min，再重复该步骤一次。
  8. 小心去掉多余的 Buffer，将载玻片缓慢放入 DNA 水平电泳槽，电压：1 V/cm，电泳 10 min。
  9. 将电泳完成的载玻片浸入 70%的乙醇中，放置 5 min。
  10. 去掉多余的乙醇，风干载玻片上的包含了样品的凝胶，使所有细胞处于同一平面，便于显微观察。
  11. 染色，取 50  $\mu$ l 预先稀释好的 SYBR Green I (试剂盒提供，稀释 10,000 倍) 点到样品上，室温黑暗中放置 5 min，将多余的染料收集到废液缸内，黑暗中风干载玻片。
  12. 载玻片上加一滴甘油，盖盖玻片。
  13. 荧光显微镜下观察，40 或 60 倍物镜下拍照 (图 1A-1D)，所有图片保存或转换为 bmp 格式，便于后期数据处理。
  14. 在网站 <http://autocomet.com/details.php> 下载 cometscore 软件，将所拍图片导入该软件，选定“彗星”区域，软件会自动算出尾部 DNA 所占整个细胞 DNA 的含量 (T%)，该值为定量评价每个细胞的 DNA 片段化程度的指标，每次实验推荐至少随机分析 100 个细胞。
  15. 选 4 种典型的 DNA 片段化的细胞，即无 DNA 片段化、低程度片段化、中等程度片段化和严重的片段化，首先算出这 4 种细胞的 T%值范围，这 4 种细胞分别赋值为 0 (无 DNA 片段化), 1 (低程度片段化), 2 (中等程度片段化)和 3 (严重的片段化)，参照这一标准，再将以计算过 T%的 100 个细胞分别赋相应的值，将 100 个细胞的赋值相加即是该处理样品的 DNA 片段化程度值(图 1E)。

## 结果与分析

Comet assay 检测野生型中花 11 和 *osapi5-1* 突变体不同发育时期花药的 DNA 片段化程度(图 1A, 1B, 1C, 1D)。



**图 1. Comet assay 检测野生型中花 11 和 *osapi5-1* 突变体不同发育时期花药的 DNA 片段化程度。** A. 小孢子早期野生型中花 11 花药单细胞电泳后染色结果。B. 小孢子早期 *osapi5-1* 突变体花药单细胞电泳后染色结果。C. 液泡化花粉期野生型中花 11 花药单细胞电泳后染色结果。D. 液泡化花粉期 *osapi5-1* 突变体花药单细胞电泳后染色结果。E. 利用软件定量分析单细胞电泳后每个细胞的 DNA 断裂程度 (拖尾的 DNA 占总 DNA 的含量, T%), 将每个细胞算出的 T% 小于 10% 赋值为 0, 介于 10%-20% 赋值为 1, 20%-30% 赋值为 2, 30% 以上的赋值为 3, 每次材料随机选取 100 个细胞核, 计算其赋值的总值, 该值代表该材料的 DNA 片段化程度。每个时期的材料做 3 次生物学重复。