

目 录

第一章 基本型实验.....	1
第一节 细胞的形态、结构观察及组成显示.....	1
实验 1 血细胞装片及涂片的制备及染色观察	2
实验 2 植物细胞的叶绿体、线粒体及液泡观察	6
实验 3 蟾蜍胸骨剑突软骨细胞高尔基体的中性红染色	7
实验 4 马铃薯和花生徒手切片的制备及细胞内多糖、脂肪的染色	8
实验 5 孚尔根法显示细胞中的 DNA	10
实验 6 甲基绿-派洛宁染色法显示细胞中的 DNA 和 RNA	11
实验 7 考马斯亮蓝染色法显示洋葱鳞茎内表皮及巨噬细胞的细胞骨架	13
实验 8 酸性磷酸酶法显示巨噬细胞溶酶体	16
实验 9 细胞中过氧化物酶体的显示	18
实验 10 酶免疫细胞化学法显示人 T 细胞表面 CD3 分子	19
实验 11 细胞大小的显微测量	21
第二节 细胞计数	23
实验 12 细胞计数	23
第三节 细胞生理	25
实验 13 哺乳动物红细胞膜的通透性检测	26
实验 14 植物细胞质壁分离现象观察及质壁分离法测定基态渗透值	27
实验 15 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬现象观察及吞噬活性检测	29
实验 16 台盼蓝染料排除法检测活细胞比率	32
第四节 细胞分裂	33
实验 17 压片法制备植物组织细胞分裂标本片及分裂各期细胞特征观察	34
实验 18 滴片法制备动物细胞分裂标本片及细胞分裂指数分析	35
第五节 细胞裂解及效果检测	38
实验 19 小鼠腹水瘤细胞裂解及乳酸脱氢酶活性检测	39
第六节 细胞器的分离	40
实验 20 植物细胞叶绿体的分离	41

实验 21 动物细胞线粒体的分离	43
第七节 细胞融合	45
实验 22 PEG 介导的细胞融合	46
参考及拓展阅读文献	47
第二章 综合型实验	49
第一节 细胞的分离与分选	49
实验 23 密度梯度离心法分离血液单个核细胞	50
实验 24 免疫磁珠分选法分离小鼠脾脏 CD4 ⁺ T 淋巴细胞	52
实验 25 T 细胞的免疫荧光标记及流式细胞仪分选	54
第二节 细胞培养	56
实验 26 贴壁细胞的原代培养	58
实验 27 贴壁细胞的传代培养	61
实验 28 细胞冻存与解冻复苏	63
实验 29 动物外周血细胞培养及染色体制备	66
第三节 细胞增殖及细胞活力检测	68
实验 30 MTT 比色法检测细胞增殖与活力	68
实验 31 CCK-8 法检测细胞增殖与活力	70
第四节 细胞黏附与迁移分析	71
实验 32 肿瘤细胞黏附能力分析	72
实验 33 检测肿瘤细胞侵袭能力的 Transwell 小室实验	74
实验 34 肿瘤细胞迁移的划痕实验 (wound scratch assay)	75
第五节 细胞的激活及信号转导分子检测	76
实验 35 利用钙离子荧光探针检测细胞内 Ca ²⁺ 浓度	77
实验 36 信号蛋白磷酸化水平检测	79
实验 37 转录因子 NF- κ B 活性检测	82
第六节 哺乳动物细胞转基因及表达检测	84
实验 38 绿色荧光蛋白基因转染体外培养的小鼠成纤维细胞及表达检测	85
第七节 细胞周期调控及检测	87
实验 39 利用流式细胞术分析细胞周期时相	88
实验 40 细胞周期蛋白 D1 基因转染细胞及细胞周期检测	91
实验 41 胸腺嘧啶脱氧核苷 (TdR) 双阻断法同步化培养动物细胞	93
实验 42 秋水仙胺阻抑法分离贴壁培养的哺乳动物 M 期细胞	95
实验 43 植物细胞中期同步化诱导	97
参考及拓展阅读文献	98



实验材料、试剂及器材

1. 材料

- (1) 健康小白鼠：6~8 周龄健康小白鼠，实验前 1~2 天，每只腹腔注射 4% 淀粉肉汤 1mL。
- (2) 抗凝鸡血。
- (3) 培养过夜的大肠杆菌 DH5 α 菌液。

2. 试剂

- (1) 4% 淀粉肉汤：牛肉膏 0.3g，蛋白胨 1.0g，氯化钠 0.5g，可溶性淀粉 4g，蒸馏水 100mL，高压蒸汽灭菌 20min，保存于 4℃ 冰箱。
- (2) D-Hanks 液：配法见附录一。
- (3) 180IU/mL 肝素钠生理盐水溶液。
- (4) 0.067mol/L 的 PBS (pH6.8)：配法见附录一。
- (5) 甲醇。
- (6) 吉姆萨染液储存液：配法见附录一。
- (7) 吉姆萨染液应用液：将储存液用 0.067mol/L 的 PBS 进行 1 : 20 稀释。

3. 仪器和用具

普通光学显微镜、10mL 低速离心机、托盘天平、水浴箱 (37℃)、5mL 一次性注射器、10mL 玻璃离心管、10mL 聚丙烯试管、试管架、胶头滴管、载玻片染色盒等。



实验操作

1. 配制 5% (V/V) 鸡红细胞悬液

肝素抗凝采集鸡静脉血 2mL，用 D-Hanks 液洗 2 次，第一次 1000r/min 离心 5min 弃上清，第二次 2000r/min 离心 10min，弃上清；按压积红细胞体积用 D-Hanks 液调成 5% (V/V) 的细胞悬液。

2. 大肠杆菌 DH5 α 菌液准备

培养过夜的大肠杆菌 DH5 α 菌液，用 D-Hanks 液洗 2 次，每次 4000r/min 离心 8min 弃上清，最后用原液 2 倍体积的 D-Hanks 液重悬细胞。

3. 巨噬细胞收集

脱颈 (颈椎脱臼法) 处死小鼠，随即向腹腔注入 2mL D-Hanks 液，揉匀。3min 后沿腹部中线剪开皮肤并向两边撕开，暴露腹膜，然后用带针头的注射器抽取小鼠腹腔液，去掉针头注入聚丙烯试管。注意：抽取腹腔液时应用左手将内脏推向一侧，给针头留出空隙，否则针头易被腹腔内的肠及肠系膜等柔软组织堵塞。



实验原理

活细胞表面保留有较完整的抗原或受体,人成熟 T 细胞表面标记分子为 CD3,用荧光素标记的鼠抗人 CD3 单抗与 T 细胞表面 CD3 分子反应后,可在 CD3 分子所在部位形成 CD3-荧光素标记抗 CD3 抗体复合物,在荧光显微镜及激光共聚焦显微镜下可观察到荧光,显示 CD3 在 T 细胞表面的分布。也可用流式细胞仪分选 CD3 阳性细胞。



实验材料、试剂及器材

1. 材料

新采集的抗凝人静脉血,用前保存于 4℃ 冰箱。

2. 试剂

(1) 500IU/mL 的肝素钠生理盐水溶液。

(2) 0.9%氯化钠生理盐水。

(3) 人淋巴细胞分离液。直接购买。

(4) DPBS (pH7.4): 配法见附录一。

(5) 抗体稀释液: 含 1%牛血清白蛋白和 0.1% 叠氮化钠的 DPBS。

(6) 荧光素 FITC 标记的抗人 CD3 单抗。按试剂盒要求的稀释倍数用含 1%牛血清白蛋白和 0.1% 叠氮化钠的 DPBS 稀释成工作液。

(7) 洗涤缓冲液: 含 5%胎牛血清的 DPBS。配制方法: DPBS 900mL, 胎牛血清 (FCS) 50mL (终浓度 5%), 4%叠氮化钠 50mL (终浓度 0.2%)。

3. 仪器和用具

10mL 低速离心机、托盘天平、荧光显微镜或激光共聚焦显微镜、水浴箱、低温冰箱、10mL 带盖刻度离心管、EP 管、1000 μ L 微量加样器及枪头、载玻片及盖玻片等。



实验操作

1. 人血液单个核细胞分离及调浓度

(1) 用生理盐水 1:1 稀释血液。

(2) 分离单个核细胞。2mL 分离液+2mL 稀释血; 2000r/min 离心 20min; 吸取两液界面细胞转入 10mL 离心管。

(3) 洗涤淋巴细胞。加 5mL 生理盐水, 混匀, 2000r/min 离心 10min, 弃上清; 另加 1mL DPBS 重悬细胞。

(4) 细胞计数及调浓度。计数并用 DPBS 调浓度为 1×10^7 个/mL。

于贴壁型细胞，只有少数细胞类型如多数血细胞、某些血液来源的肿瘤细胞可在悬浮状态下生长。

实验 26 贴壁细胞的原代培养



实验原理

模仿体内生长环境，使来自机体的细胞、组织、器官能够在人工培养条件下生存、生长、繁殖。鸡胚肌肉组织含有大量可贴壁生长的细胞，可以作为材料进行贴壁细胞的原代培养。



实验材料、试剂及器材

1. 材料

7~12 日龄的鸡胚。

2. 试剂

(1) D-Hanks 液：配法见附录一。

(2) 含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶溶液：配法见附录一。0.22 μ m 滤膜过滤除菌，保存于 4℃ 冰箱。

(3) M199 基础培养液。

(4) 小牛血清：56℃ 水浴 30min 灭活。

(5) 青霉素储存液：用无菌水配成 5 万 IU/mL，分装于 EP 管，-20℃ 冻存。

(6) 链霉素储存液：用无菌水配成 5 万 μ g/mL，分装于 EP 管，-20℃ 冻存。

(7) 5% NaHCO₃。

(8) 2% 碘酒：2g 碘溶于 20mL 蒸馏水中，加 75mL 95% 乙醇，再加 105mL 75% 乙醇。

(9) 75% 乙醇。

(10) 重铬酸钾洗液：由重铬酸钾、浓硫酸和蒸馏水按一定比例配制而成。

(11) 0.4% 台盼蓝生理盐水染液：配法见附录一。

(12) M199 完全培养液：

M199 基础培养液	500mL
小牛血清	60mL
青霉素 (500 $\times$)	1.2mL
链霉素 (500 $\times$)	1.2mL

调 pH 至 6.8~7.2, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。

3. 仪器和用具

纯水设备、电热干燥箱、高压蒸汽灭菌锅、细胞培养间及超净工作台、CO₂ 培养箱、普通低温冰箱、倒置相差显微镜、托盘天平、10mL 离心机、水浴锅 (37℃)、解剖器械 (眼科剪、眼科镊)、酒精灯、过滤器及 0.22 μ m 滤膜、青霉素瓶、培养瓶或培养皿、细胞计数板、10mL 离心管、胶头吸管等。

实验操作

1. 消毒鸡胚

75%乙醇浸泡 3~5min。

2. 取材及洗涤

从鸡胚腿部取约 0.5cm³ 大小的肌肉, 放入预先加有 3mL D-Hanks 液的青霉素瓶中。用胶头吸管吸弃脏的 D-Hanks 液, 另加 1mL 干净的 D-Hanks 液。

3. 分割组织

用手术剪将组织块剪成约 1mm³ 小块, 再用 D-Hanks 液洗 3 次。

4. 加酶消化

加 2mL (不少于 5~6 倍体积) 的 0.25% 胰酶液, 37℃ 水浴中消化 25~30min。期间每隔 5min 摇荡离心管 1 次。

5. 终止消化

加入 5mL 完全培养液终止胰酶消化作用。

6. 吹打离散细胞

用吸管吸打细胞液 1~2min。

7. 静置

使未消化组织块下沉。

8. 离心收集细胞

将上层悬液转入另一离心管中, 1500r/min 离心 8min, 弃上清液。然后视细胞量多少加入 1~2mL 完全培养液混匀。

9. 细胞计数及活率检测

方法分别见实验 12 和实验 16。

10. 细胞调浓度

根据计数结果, 用 M199 完全培养液将细胞浓度调整到 5×10^5 个/mL 左右, 按每个 25mL 的培养瓶或每个 6cm 平皿分装 5mL 细胞悬液。

11. 细胞培养

37℃、5%CO₂ 培养箱培养。

4. 滴片法制备染色体标本的注意事项同实验 19。



作业与思考题

如不给培养液中加 PHA，淋巴细胞会出现增殖反应吗？

第三节 细胞增殖及细胞活力检测

细胞增殖和细胞活力 (cell viability) 是细胞研究者经常需要检测的项目。用于研究某些细胞本身的增殖特性、生长因子和毒性物质对细胞增殖和活力的影响等。因此，将该类实验列入细胞生物学实验课教学内容很有实践意义。

反映细胞增殖最直接的方法为简单计数法。该法简单，用于快速分裂的细胞如细菌也是可行的。缺点是敏感度低，不能反映细胞分裂前 DNA 复制的变化，一般不用于真核细胞增殖检测。

$^3\text{H-TdR}$ (氚标记的胸腺嘧啶核苷) 掺入法很敏感，能够显示 DNA 的复制情况；缺点是存在同位素污染及危害问题，限制了其应用。

目前普遍应用的检测方法是噻唑盐比色法，是一类通过检测细胞代谢活性间接反映细胞增殖的方法。基本原理是，活细胞的线粒体酶能够将噻唑盐转换成水溶性产物或水不溶有色沉淀，活细胞数量越多，形成的有色水溶性产物及沉淀越多，通过直接比色或溶解沉淀再比色，就可反映细胞数量，继而反映细胞增殖、增殖抑制或细胞毒作用。依所使用的噻唑盐种类不同，具体检测方法有：MTT 法、XTT 法、MTS 法、CCK-8 (cell counting kit-8) 法、WST-1 法及 WST-8 法等。这些方法操作简单，使用安全，检测灵敏度高，因而广泛应用于生物学和医学研究的多个领域。其中的 MTT 法建立最早且目前应用最广，也是我国药典和美国药典收录的方法。其优点是，方法成熟、检测成本低；缺点是 MTT 被还原形成的有色产物为沉淀，需要溶解后才能比色，检测结果受到沉淀溶解效果的影响，检测用时也较长。其他几种方法所用噻唑盐及转化的产物为水溶性的，是由日本同仁化学研究所、Sigma 公司等近几年新开发出来的。这些方法无需溶解甲臆就可直接比色，比 MTT 法应用相对方便、省时，缺点是检测成本偏高。其中的 CCK-8 法因为检测试剂水溶性更强、更易于保存且检测灵敏度更高而应用最多。

实验 30 MTT 比色法检测细胞增殖与活力



实验原理

MTT 即 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐，商品名噻唑蓝。

显微镜下看到细胞边缘收回、细胞变圆即可。可轻轻晃动瓶/皿，使酶液更好地作用。

2. 终止消化

按 1:5 的比例加入 DMEM 完全培养液终止消化。

3. 离散细胞

用吸管吸取培养液吹打培养瓶/皿底部使细胞脱离，用显微镜检查确保绝大多数（多于 90%）细胞脱离底部。

4. 收集细胞

将细胞悬液转入带盖离心管，1500r/min 离心 5min，弃上清，留细胞沉淀。

5. 细胞计数

向细胞沉淀加 2mL DMEM 完全培养液重悬细胞，计数并调整细胞浓度为 8×10^4 个/mL。

6. 重新接种

24 孔板每孔接种细胞悬液 1mL，细胞数 8×10^4 个。

7. 细胞培养

37℃ 培养新接种的细胞，12h 后用于细胞转染（细胞布满底部 40%~50%）。

（二）基因转染

1. 待转染试剂的准备

一个 24 孔板每孔用量如下。

质粒 DNA：1μL 质粒 DNA 溶液（含质粒 DNA 1μg）+ 30μL 无血清 DMEM 培养液。

转染试剂：2μL 梭华 Sofast™ 溶液（含聚阳离子试剂 10μg）+ 30μL 无血清 DMEM 培养液。

将转染试剂加入质粒 DNA 中，边加边用涡旋振荡器混匀，室温静置 15min。

2. 转染

（1）弃细胞培养液，每孔加 0.5mL 含血清 DMEM 培养液。

（2）将 60μL 转染混合液加在培养的细胞中，轻轻摇动混匀。

（3）37℃ 培养 48h。

3. 结果直接观察

在基因转染 48h（或更长时间）后，用倒置荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察转染情况，阳性细胞发出明亮的绿色荧光，阴性细胞无荧光。激光共聚焦显微镜比倒置荧光显微镜更敏感，绿色荧光蛋白表达量不高时前者能观察到而后者不易见。计数 100 个细胞，求阳性细胞百分率。

37℃、5%CO₂培养箱中培养至细胞融合度达70%左右，一般过夜培养即可。

(2) 质粒转染：按试剂盒说明，采用标准的磷酸钙法分别转染空载质粒 pRK5 和 pRK5-cyclinD1 于不同的细胞孔。

(3) 收集细胞：转染 24h 后倒掉培养液，加入 1mL PBS 液，用细胞刮刮下细胞，收集到 EP 管中，1000r/min 离心 5min，弃上清。

(4) 洗涤细胞：加入 1mL PBS，用移液器吹打混匀（务必吹散），1000r/min 离心 5min，弃上清；再加 1mL PBS 洗细胞 1 次，弃大部分上清，留余液 0.1~0.2mL，将细胞分散。

(5) 固定细胞：一边用涡旋振荡器振荡细胞一边逐滴加入 1mL 4℃ 预冷的 70%乙醇到细胞悬液中，加完再振荡数秒，于 4℃ 至少固定 18h。

(6) 洗细胞：2000r/min 离心 5min 收集固定过的细胞，再用 PBS 洗 2 次。

(7) 降解 RNA：用 0.4mL PBS 重悬细胞并转至 EP 管中轻轻吹打（防止细胞破碎）混匀，加 RNase A 至终浓度约为 50μg/mL，37℃ 水浴作用 30min。

(8) PI 染色：加 PI 至终浓度为 50μg/mL，在冰浴中避光染色 10min。

(9) 流式细胞仪检测：分析细胞周期中 G₁ 期、S 期和 G₂/M 期各时相的百分比。



注意事项

1. 每步操作过程中应使细胞充分分散，故离心时间和转速是关键，要使细胞比容不过紧，又不至于丢失太多细胞。

2. 振荡器稍加振荡，但切勿用力吹打或剧烈振荡，以免细胞破碎。

3. 细胞悬液中如含显微镜下可见的细胞团块，应过滤后上机。



作业与思考题

用已学过的实验知识设计实验，使能够在无流式细胞仪的情况下检测胞内 cyclin D1 蛋白含量变化对细胞周期的影响。

实验 41 胸腺嘧啶脱氧核苷 (TdR) 双阻断法 同步化培养动物细胞



实验原理

胸腺嘧啶脱氧核苷 (deoxyribonucleotid thymine, TdR) 简称胸苷 (thymidine)，是 DNA 合成不可缺少的前体物，如果在培养液中过量，可反馈性地抑制其他核苷酸的磷酸化，产生抑制 DNA 合成的效应，使细胞周期停留在某一特定

实验 43 植物细胞中期同步化诱导



实验原理

羟基脲能够抑制核苷酸还原酶的活性，将细胞分裂阻止在 G_1/S 期；甲基胺草磷能够抑制微管蛋白形成，可将细胞分裂阻止在中期。羟基脲 (hydroxyurea, Hu) 和甲基胺草磷 (amiprophos-methyl, APM) 双阻断法可诱导植物细胞分裂停止于中期。



实验材料、用品及试剂

1. 材料

小麦种子。

2. 试剂

- (1) 1.25mmol/L Hu。
- (2) 4 μ mol/L APM。
- (3) 3 : 1 乙醇 : 冰醋酸。
- (4) 70%乙醇。
- (5) 解离液：10% (V/V) 盐酸。
- (6) 醋酸洋红染液：配法见附录一。

3. 仪器和用具

显微镜、刀片、镊子、恒温培养箱、恒温水浴锅、小烧杯等。



实验操作

- (1) 将小麦种子在室温下浸泡过夜。
- (2) 于 23℃ 恒温箱中先用 1.25mmol/L Hu 浸泡处理种子 18h；蒸馏水洗 3 次；水培 4h；再在 4 μ mol/L APM 中培养 4~5h；蒸馏水洗 3 次。
- (3) 制备根组织压片：按照实验 17 的方法，常规固定、酸解、染色、压片。
- (4) 显微观察根尖细胞有丝分裂中期相的数目。



注意事项

1. 注意 Hu 和 APM 的处理时间。Hu 处理时间不能过长，否则会对细胞的恢复有影响。已经发现，用 Hu 处理动、植物细胞超过 24h，可诱发染色体断裂和姊妹染色单体的不可逆互换。

2. Hu 处理、水培及 APM 处理都应避光进行。

- 周开梅. 2010. 细胞周期蛋白在恶性肿瘤中的表达. 医学综述, 16 (4): 533-536.
- 朱丽红, 毕伟, 陆大祥, 等. 2010. 胸腺嘧啶核苷双阻断法诱导 SGC-7901 细胞周期同步化研究. 中国病理生理杂志, 26 (11): 2097-2100.
- Davies D. 2012. Cell separations by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 878: 185-199.
- Eccles S A, Box C, Court W. 2005. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. *Biotechnology Annual Review*, 11: 391-421.
- Fox M H. 2004. Methods for synchronizing mammalian cells. *Methods in Molecular Biology*, 241: 11-16.
- Franchi L, Macino G. 2007. *In vitro* phosphorylation and kinase assays in *Neurospora crassa*. *Methods in Molecular Biology*, 362: 407-412.
- Hang H, Fox M H. 2004. Analysis of the mammalian cell cycle by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 241: 23-35.
- Helgason C D, Miller C. 2005. Basic cell culture protocols. New York: Humana Press.
- Humphries M J. 2009. Cell adhesion assays. *Methods in Molecular Biology*, 522: 203-210.
- Ibrahim S F, van den Engh G. 2007. Flow cytometry and cell sorting. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 106: 19-39.
- Ito Y, Shinomiya K. 2001. A new continuous-flow cell separation method based on cell density: principle, apparatus, and preliminary application to separation of human buffy coat. *J Clin Apher*, 16 (4): 186-191.
- Jackman J, O'Connor P M. 2001. Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Current Protocols in Cell Biology*, Chapter 8: Unit 8. 3.
- Jordan M A, Wilson L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4 (4): 253-265.
- Kamala T. 2008. An optimized immunomagnetic bead-based negative selection protocol for CD4 T-cell isolation from mouse lymph nodes and spleen. *Scand J Immunol*, 67 (3): 285-294.
- Lee J H, Arumuganathan K, Kaeppler S M, et al. 1996. Cell synchronization and isolation of metaphase chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting. *Genome*, 39 (4): 697-703.
- Liang C C, Park A Y, Guan J L. 2007. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols*, 2 (2): 329-333.
- Masters J. 2000. Animal cell culture: a practical approach. Oxford: Oxford University Press.
- Matheu M P, Cahalan M D. 2007. Isolation of CD4⁺ T cells from mouse lymph nodes using miltenyi MACS purification. *Journal of Visualized Experiments*, 9: 409.
- Rosner M, Schipany K, Hengstschläger M. 2013. Merging high-quality biochemical fractionation with a refined flow cytometry approach to monitor nucleocytoplasmic protein expression throughout the unperturbed mammalian cell cycle. *Nature Protocols*, 8 (3): 602-626.
- Smale S T. 2010. Luciferase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 5: 1-3.



实验操作

1. 收集腹水瘤细胞

脱颈处死小鼠，参照本书实验 15 抽取腹腔液的方法分别抽取对照和实验小鼠含瘤腹水。

2. 洗涤并调细胞浓度

取腹腔液 0.5mL，加 5mL 0.01mol/L PBS 洗涤细胞 1 次，1500r/min 离心 5min，弃上清液，再用 PBS 将肿瘤细胞配成 5% 的悬液。

3. AnnexinV-FITC/PI 双染色

(1) 在 1.5mL EP 管中加入 5% 的肿瘤细胞悬液 0.5mL，2000r/min 离心 5min，弃上清液。

(2) 加入 300 μ L 结合缓冲液悬浮细胞。

(3) 加入 5 μ L 的 AnnexinV-FITC 混匀，避光，室温染色 15min。

(4) 加入 5 μ L 的 PI 染色 5min。

4. 制备装片，荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察，也可用流式细胞仪分析

(1) 正常细胞：胞膜完整，核不被 PI 染色；PS 在膜内侧，也不被 Annexin V-FITC 染色；荧光显微镜下不被观察。

(2) 凋亡早期细胞：胞膜完整，核不被 PI 染色；但 PS 外翻，被 Annexin V-FITC 染成绿色；荧光显微镜下膜显示绿色。

(3) 凋亡晚期细胞：PS 与 Annexin V-FITC 结合使膜显示绿色；膜通透性增大，PI 使核显示红色。

(4) 胀亡细胞：膜不完整，几乎被 AnnexinV-FITC 染色；核被 PI 染成红色。



注意事项

1. Annexin V 和磷脂酰丝氨酸结合依赖钙离子，因此，结合缓冲液中一定要含钙离子；加 Annexin V-FITC 反应后避免用 PBS（不含钙离子）洗涤细胞，以防止 Annexin V-FITC 脱色。

2. 胰酶与 EDTA 抑制凋亡细胞 PS 与 Annexin V-FITC 的结合。因此若是贴壁细胞，消化后一定要将胰酶和 EDTA 洗涤干净。

3. PI 具有毒性及潜在致畸作用，使用时注意防护及避免环境污染。

4. Annexin V-FITC 和 PI 应避光保存于 2~8℃，避免反复冻融。

5. 细胞过多会影响染色及检测结果，应控制细胞浓度。

的变化。例如,细胞体积增大,变形;贴壁细胞在光镜下观察变得宽大、扁平、胞质内色素和空泡增多、折光率低;核内染色质异常固缩。细胞膜系统流动性降低,选择通透性变差;线粒体数量减少,体积增大,嵴排列紊乱;粗面内质网总量减少,排列有序性下降,蛋白质合成能力降低;蛋白质转运异常;溶酶体数量增多;胞质微丝骨架和核骨架异常;细胞水分减少、胞质中出现一些非生命物质。可通过相应方法进行检测。目前应用较多的是 β -半乳糖苷酶染色法,其他还有端粒酶活性检测和衰老相关基因表达的检测。

实验 50 细胞 ROS 的流式细胞仪检测



实验原理

荧光探针 DCFH-DA (双氢-乙酰乙酸二氯荧光黄) 在通过细胞膜以后,可被细胞内的酯酶转化成没有荧光的 DCFH。如果细胞内有 ROS 存在,这种化合物会被迅速氧化成有高荧光强度的 DCF (二氯荧光黄)。通过流式细胞仪检测细胞内 DCF 的荧光强度就可显示细胞内 ROS 水平。



实验材料、试剂及器材

1. 材料

H_2O_2 诱导衰老的 NIH-3T3 小鼠成纤维细胞或其他细胞。

2. 试剂

(1) D-Hanks 液: 配法见附录一。高压蒸汽灭菌。

(2) 含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶溶液: 配法见附录一。0.22 μ m 滤膜过滤除菌。

(3) 小牛血清: 56 $^{\circ}C$ 水浴灭活 30min。

(4) DMEM 基础培养液: 粉剂或溶液, 直接购买。

(5) 青霉素储存液: 用无菌水配成 5 万 IU/mL, 分装于 EP 管, -20 $^{\circ}C$ 冻存。

(6) 链霉素储存液: 用无菌水配成 5 万 μ g/mL, 分装于 EP 管, -20 $^{\circ}C$ 冻存。

(7) 含 10% 小牛血清的 DMEM 完全培养基: 配法见附录一。0.22 μ m 滤膜过滤除菌。

(8) 碧云天活性氧检测试剂盒, 包括: DCFH-DA, 10mmol/L; 活性氧阳性对照 Rosup, 50mg/mL。

3. 仪器和用具

流式细胞仪、纯水设备、电热干燥箱、高压蒸汽灭菌锅、细胞培养间及超净工作台、CO₂ 培养箱、普通低温冰箱、倒置相差显微镜、托盘天平、10mL 离心

心管、胶头吸管等。



实验操作

1. 细胞准备

按照本书实验 27 的方法, 收获培养的 NIH-3T3 细胞, 用 DMEM 完全培养液调浓度为 1×10^6 个/mL。

2. 细胞再培养

将 2.5 mL 细胞悬液接种于预先放有灭菌盖玻片的 6 孔细胞培养板中, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养至细胞融合度达到 60%~70%。

3. 衰老诱导

弃培养液, 加入含 $50 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的 PBS 中, 于 37°C 孵育 30 min, 弃去 H_2O_2 溶液, 用 PBS 轻轻漂洗细胞 3 次, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养。

4. 重复

每隔 2 天重复处理一次, 共 4 次。

5. 对照细胞培养

检测前 2 天, 将未经处理的细胞培养于 6 孔细胞培养板预先放入小盖玻片的其他孔中。

6. 观察

衰老细胞与正常细胞的显微观察。

7. 细胞的 β -半乳糖苷酶染色

(1) 取实验组及对照组细胞, 弃去培养基, 用 PBS 洗 3 次。

(2) 加入固定液, 室温固定 5 min。

(3) 将细胞用 PBS 洗 3 次。

(4) 细胞染色: 在标本上滴加适量新配置的染色液, 恒温箱 37°C 孵育 2~4 h。

(5) 弃染色液, 细胞用灭菌水漂洗 3 次。

8. 显微观察

衰老细胞呈蓝色; 正常细胞不染色。



注意事项

1. 染色液的 pH 很重要, 应严格为 6.0。

2. 染色反应不要在 CO_2 培养箱中培养, 以免影响染色酸碱环境。

3. β -半乳糖苷酶染色液使用前必须确保沉淀全部溶解并且混匀。

4. 固定液有一定的腐蚀性和毒性, 操作时请注意防护。

血干细胞分化为心肌样细胞。



实验材料、试剂及器材

1. 材料

成年健康 SD 大鼠。

2. 试剂

(1) 20% (m/V) 乌拉坦。

(2) 70% 的乙醇。

(3) PBS: NaCl 8g, KCl 0.2g, NaH_2PO_4 1.44g, KH_2PO_4 0.24g, 去离子水 800mL 搅拌使各种试剂溶解后, 用 HCl 调 pH 至 7.2~7.4, 再加水至 1000mL。

(4) 含肝素钠 50IU/mL 的 PBS。

(5) 大鼠淋巴细胞分离液。

(6) 含 2mmol/L EDTA 的 PBS。

(7) CD34 磁珠 (QBEND10)。

(8) 胎牛血清。

(9) DMEM 低糖培养基。

(10) 0.25% 胰酶: 用 PBS 配。

(11) FcR 封闭试剂。

(12) 大鼠 IL-3 (白细胞介素-3)、IL-6 (白细胞介素-6)、CSF (干细胞因子)。

3. 仪器和用具

CD34 磁珠及磁珠分离设备、流式细胞仪、解剖器械、培养瓶、倒置显微镜、CO₂ 培养箱等。



实验操作

(一) 收获大鼠骨髓细胞

1. 大鼠麻醉

按 1g/kg 体重给大鼠腹腔注射浓度 20% 的乌拉坦麻醉大鼠。

2. 消毒大鼠

用 70% 的乙醇浸泡大鼠消毒 3min。

3. 取骨

在超净工作台内无菌取双侧股骨和胫骨, 将上面附着肌肉剔除干净。

4. 收集骨髓细胞

剪开骨头两头, 用 5mL 带针头的注射器吸取含肝素钠的 PBS 将骨髓腔内细

(3) 每孔加 100 μ L 过氧化物酶标记的抗地高辛抗体, 20 $^{\circ}$ C、300r/min 摇床振荡孵育 30min。

(4) 用清洗缓冲液洗板 5 次, 每孔加 250 μ L, 每次 30s, 弃去清洗液。

(5) 每孔加 100 μ L TMB-H₂O₂ 底物溶液, 300r/min 摇床室温避光振荡孵育 10~15min, 至孔中液体颜色由蓝变黄。

(6) 终止反应: 每孔加入 100 μ L 终止液以终止反应。

(7) 酶标仪测定吸光值。终止 ELISA 反应后 30min 之内在酶标仪上测定 $A_{450\text{nm}}$ (参照波长为 $A_{690\text{nm}}$)。样本的吸收值读数为: $A_{450\sim 690\text{nm}}$ (待测孔) - $A_{450\sim 690\text{nm}}$ (阴性对照孔) > 0.2 , 则端粒酶活性阳性。 $A_{450\sim 690\text{nm}}$ 值为 0.2~0.4 定为 (+), 0.4~0.9 定为 (++) , > 0.9 定为 (+++)。



注意事项

1. 阳性对照的吸收值在底物反应 20min 后检测, 应 > 1.5 ($A_{450\sim 690\text{nm}}$); 而阴性对照的吸收值 ≤ 0.25 ($A_{450\sim 690\text{nm}}$), 否则整个反应需重新进行。

2. 排除假阳性, 最好设置以下 4 种对照: ① 85 $^{\circ}$ C 10min 灭活端粒酶; ② 0.5 μ g/10 μ L 提取液 + 1 μ g RNase, 37 $^{\circ}$ C, 处理 20min, 灭活端粒酶; ③ 不加提取液; ④ 不加 CX 或 TS 引物。以上实验可排除引物二聚体或 PCR 污染。



作业与思考题

1. 简单描述端粒酶活性检测原理。
2. 如何排除假阳性?



参考及拓展阅读文献

- 陈军浩, 刘勇, 邹征云, 等. 2008. 流式细胞术 Annexin V/PI 检测细胞凋亡阳性界限值及补偿值的确定. 现代检验医学杂志, 23 (4): 24-27.
- 刁勇, 许瑞安. 2009. 细胞生物技术实验指南. 北京: 化学工业出版社.
- 丁明孝, 苏都莫日根, 王喜忠, 等. 2009. 细胞生物学实验指南. 北京: 高等教育出版社.
- 洪凡青, 陈飞虎, 吴菲, 等. 2011. 新型维甲酸衍生物 ATPR 体外诱导消化系统肿瘤细胞分化的研究. 肿瘤防治研究, 38 (12): 1375-1379.
- 孔令华, 刘玉琴. 2004. 恶性肿瘤细胞诱导分化. 癌症进展杂志, 2 (6): 505-508.
- 李军尧, 唐忠志. 2004. 羟基喜树碱对人肝癌 BEL-7402 细胞毒性的评价. 华中科技大学学报 (医学版), 33 (4): 71-74.
- 李欣, 路菊. 2005. 用 Annexin V 流式细胞术检测细胞凋亡的体会. 检验医学, 20 (6): 598-599.
- 刘毅, 沈杨, 任慕兰, 等. 2011. 人卵巢实体肿瘤组织中端粒酶活性的两种检测方法的相关性研究. 东南大学学报 (医学版), 30 (6): 927-929.