

4. 细胞荧光标记检测

利用对细胞无毒性作用的荧光标记物对细胞特定结构（细胞膜、细胞质等）进行标记，标记的细胞仍保留生物学和增殖活力，通过对增殖细胞群体荧光强度的测定进而反映出细胞的增殖情况。这种方法除了用于细胞增殖外，还是研究细胞迁和细胞-细胞间相互作用的理想工具。常用活细胞荧光标记物有CFDA SE、**Calcein AM**等。



★ 细胞活力(活死细胞染色)检测试剂盒 (Calcein AM , PI法 , 适用于FACS、FM) (Meilunbio®货号 : MA0361)

通过同时检测细胞内酯酶活性和质膜完整性, 提供一种判断细胞活力的荧光染色方法。本试剂盒内含有两种染料: 钙黄绿素-AM (Calcein-AM) 和碘化丙啶 (PI), Calcein-AM可透过活细胞膜, 通过活细胞内的酯酶作用由几乎无荧光的Calcein-AM脱去AM基团生成具有强烈荧光信号的绿色荧光物质Calcein, 因此活细胞可被检测到绿色荧光。另一方面PI不能透过活细胞的细胞膜, 但当细胞膜受损时PI可进入到死细胞内并与核酸结合, 产生明亮的红色荧光, 因此死细胞会被检测到红色荧光。

用荧光显微镜或流式细胞仪或荧光酶标仪检测; 适用于大多数的真核哺乳动物细胞的细胞活力检测。

一、（可选）确定染色试剂的最佳浓度：

由于不同细胞种类、细胞浓度的染色条件不同，建议通过以下的操作自行摸索一下Calcein-AM和PI的最适浓度：

1. 制备死细胞：细胞在0.1%皂苷或0.1-0.5%毛地黄皂苷中培养10 min或在70%乙醇中培养30 min。
2. 用0.1-10 μM PI工作液染死细胞，以便找到仅针对细胞核染色而不对细胞质染色的PI浓度。
3. 用0.1-10 μM Calcein-AM工作液染死细胞，以便找到不对细胞质染色的Calcein-AM浓度，再以此浓度的Calcein-AM对活细胞染色以检验活细胞是否能被染色。

二、染色工作液的配制 (以2 μM calcein AM, 8 μM PI为例):

Calcein-AM 和 PI 推荐浓度范围为0.1~10 μM ，可以根据步骤一确定的最佳浓度来配制工作液。一般来说，满足信号足够的前提下，尽可能选择最低浓度的染料剂量。

1. 取出Calcein AM Solution和 PI Solution，室温平衡 30 分钟。
2. 在10ml 的 PBS 中加入 5 μl 的PI Solution和 5 μl 的Calcein AM Solution，涡旋震荡混匀制成工作液，此时Calcein AM的浓度为 2 μM ，PI的浓度为8 μM 。
3. 所得到的的工作液（2 μM 钙黄素 AM 和 8 μM PI）可直接用于染色细胞。

三、染色步骤:

对于贴壁细胞:

1. 可以将细胞接种至细胞培养板、微孔板或者制作成细胞爬片。悬浮细胞也可制作成细胞爬片。
2. 按照实验要求处理细胞后, 用 PBS 温和洗涤细胞2-3次, 确保除去培养基中含有的活性酯酶。
3. 加入足量的染色工作液, 保证没过单层细胞。
4. 在37°C孵育 15~30 分钟。

对于悬浮细胞:

1. 按照实验要求处理细胞后, 1,000 rpm, 3 min离心收集细胞 (10^4 - 10^5 cells)。
2. 去除上清, PBS 重悬洗涤2-3次, 确保除去培养基中含有的活性酯酶。
3. 用100 μ l 染色工作液重悬细胞, 使细胞密度大约为 10^5 - 10^6 cells/ml。
4. 在37°C孵育 15~30 分钟。

四、荧光检测和分析：

➤ 荧光显微镜检测：

1. 对于贴壁细胞：对于培养板孔中的细胞：吸出染色工作液终止孵育，加入10 μ l PBS，覆以干净的盖玻片。对于细胞爬片：在干净的载玻片上滴加10 μ l 的 PBS，覆以细胞爬片。可以以指甲油密封，防止水份蒸发。对于悬浮细胞：在干净的载玻片上滴加适量的染色的细胞溶液，覆以盖玻片。可以以指甲油密封，防止水份蒸发。

2. 在荧光显微镜下使用 490 ± 10 nm 激发波长下同时观察活细胞（黄绿色荧光）和死细胞（红色荧光）。另外使用 545 nm 激发波长单独观察死细胞。



➤ 荧光酶标仪检测：

1. 按照实验要求准备对照样本，与实验组样本一起按照步骤二、三操作。对照样品可以有：无细胞对照（G、H），活细胞对照（E、F）和死细胞对照（C、D）。死细胞对照可以按照步骤一方法制备。如果测量死活细胞的相对增量，那么对照可以不用设置。

样品编号	样品名称（细胞种类）	检测发射波长	染色液	测得结果
A	实验组细胞样品	645 nm	Calcein AM/PI	$F(645)_{sam}$
B	实验组细胞样品	530 nm	Calcein AM/PI	$F(530)_{sam}$
C	死细胞对照样品	645 nm	PI	$F(645)_{max}$
D	死细胞对照样品	645 nm	Calcein AM	$F(645)_{min}$
E	活细胞对照样品	530 nm	PI	$F(530)_{min}$
F	活细胞对照样品	530 nm	Calcein AM	$F(530)_{max}$
G	无细胞样品	530 nm	Calcein AM/PI	$F(530)_0$
H	无细胞样品	645 nm	Calcein AM/PI	$F(645)_0$

2. 贴壁细胞可直接检测。悬浮细胞：将染色好的细胞悬液以每孔 100 μ l 加入至微孔板各孔。【注：每孔细胞最低检测值大约为200-500个，每孔最大常用细胞测值约为10⁶个。】

3. 使用荧光酶标仪以合适的激发和发射滤光片收集样本数据。为了获得最佳的灵敏度，所使用的酶标仪，建议采用带光学过滤器的信号激发器，可保证不互相干扰。Calcein可以用 (490 \pm 10nm) 的荧光光学滤光器激发，而 PI 可以用 (530 \pm 12.5nm) 的典型罗丹明光学滤光器来兼容。而发射光信号可以通过滤光器得到很好的分开采集，Calcein是 530 \pm 12.5nm，PI 是 645 \pm 20nm。

4. 结果分析与计算：

死细胞的特点是在 645nm 下有强荧光信号，而 530nm 处有弱荧光信号。在计算结果之前，可以分别从 F(530) 和 F(645) 的所有值中减去背景荧光读数 F(530)₀ 和 F(645)₀。活死细胞的百分比可以定义为荧光读数的计算：

$$\text{Live Cells\%} = (F(530)_{\text{sam}} - F(530)_{\text{min}}) / (F(530)_{\text{max}} - F(530)_{\text{min}})$$

$$\text{Dead Cells\%} = (F(645)_{\text{sam}} - F(645)_{\text{min}}) / (F(645)_{\text{max}} - F(645)_{\text{min}})$$

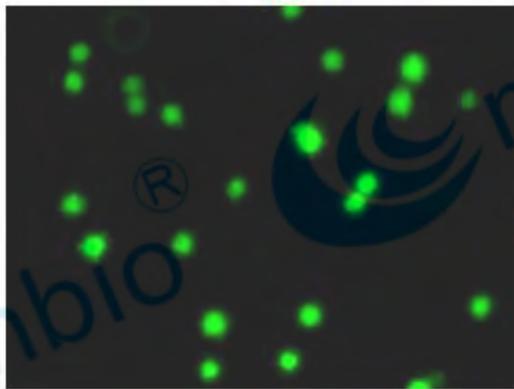
绝对活死细胞数量的计算：制作细胞数与荧光读数 (530nm和645nm) 的标准曲线，荧光强度与样本中的细胞数成线性正相关。

➤ 流式细胞仪分析：

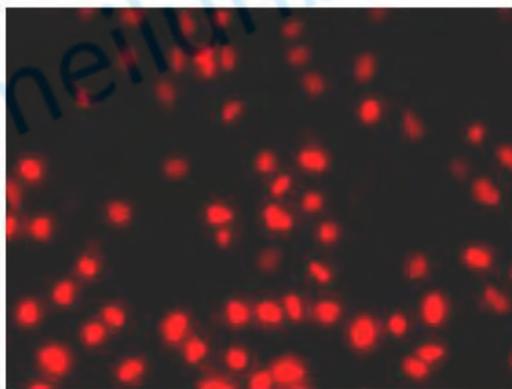
悬浮细胞或经胰酶消化的贴壁细胞，可以类同步骤二、三的悬浮细胞染色操作。染色后的细胞悬液可直接上机检测。

➤ 结果:

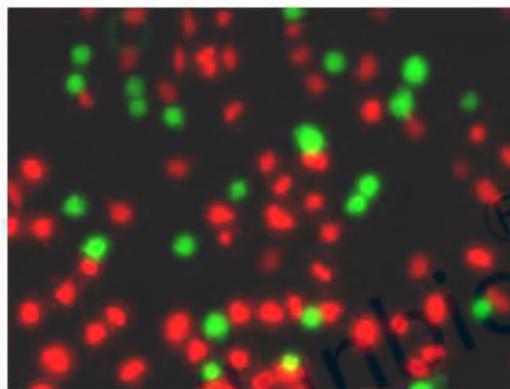
Calcein

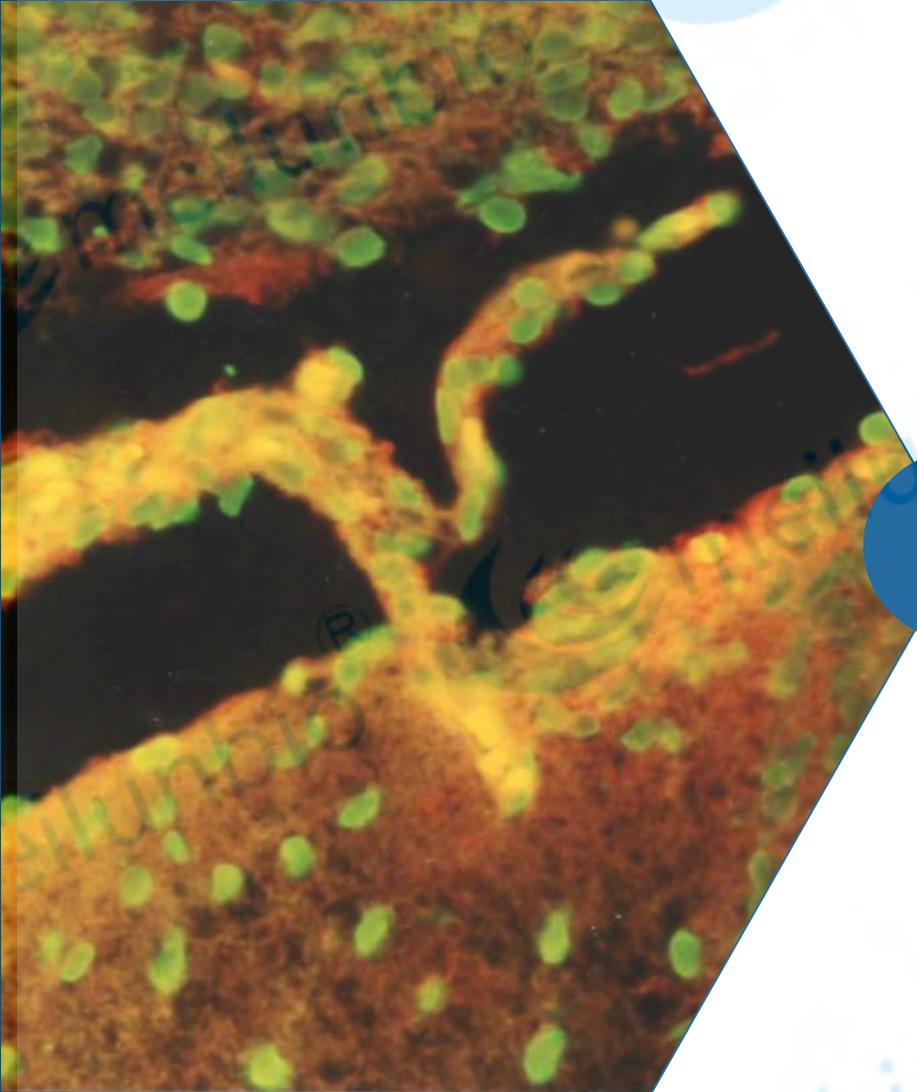


PI



Overlay



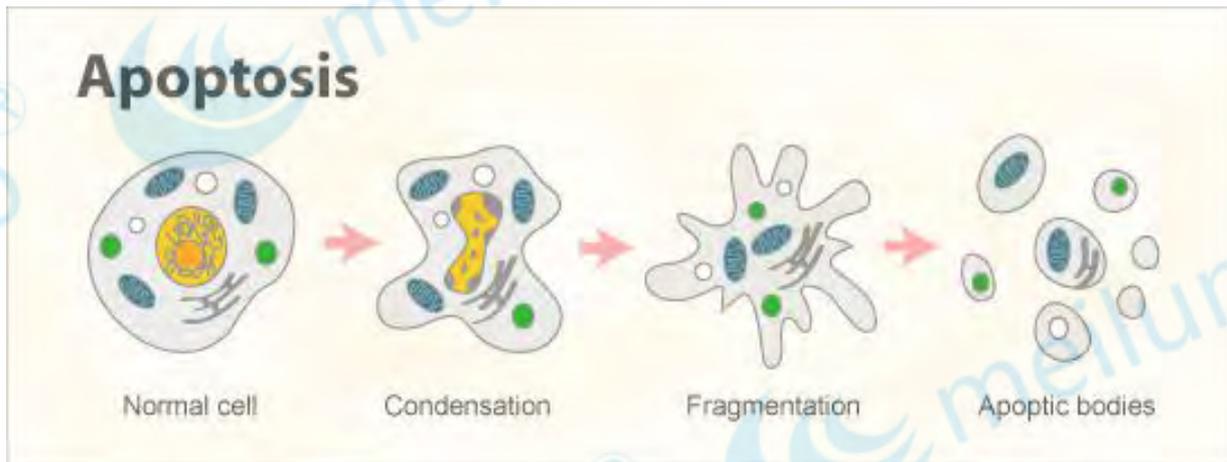


2

细胞凋亡与坏死检测

1. 磷脂酰丝氨酸外翻检测
2. 线粒体膜电位检测
3. DNA片段化检测
4. Caspase活性检测
5. 荧光标记细胞形态检测

细胞凋亡 (Apoptosis) 又称程序性细胞死亡，也称为“固缩坏死”或“细胞自杀”，是指细胞在一定的生理或病理条件下，由基因编程控制的细胞自主性、有序性的死亡过程。



- Caspase的激活在凋亡信号响应中起关键作用



- 细胞皱缩，体积缩小，细胞连接消失，与周围的细胞脱离



- 胞质密度增加，线粒体膜电位下降至消失，膜通透性改变，释放细胞色素C 到胞浆



- Caspase级联反应继续引发关键的蛋白水解表达凋亡相关蛋白



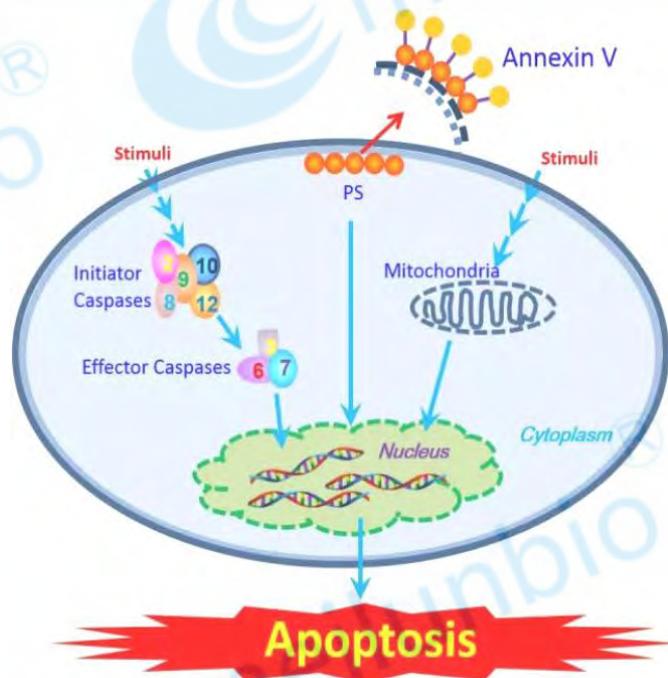
- 胞膜组成改变，有小泡状形成，膜内侧磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面，是引发凋亡细胞内吞作用的信号



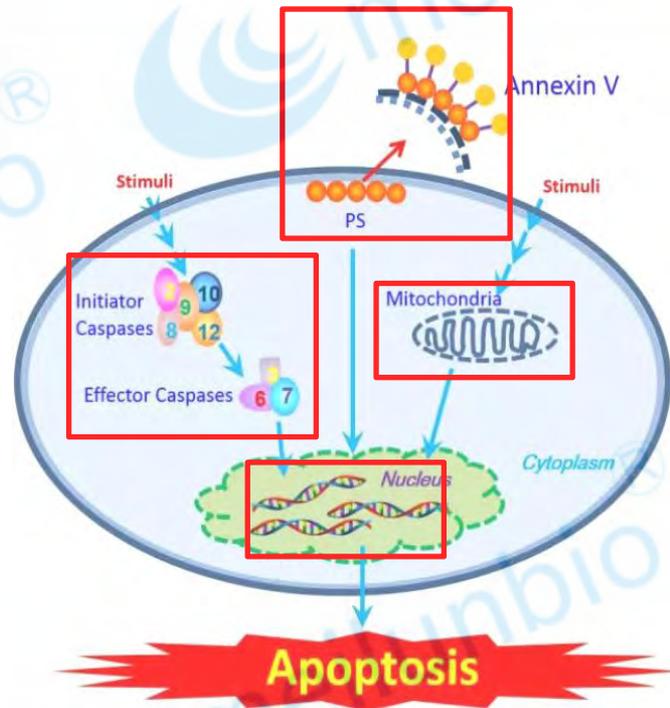
- 核质浓缩，核膜核仁破碎，DNA片段化，基因组的打断是凋亡过程中一个不可逆的过程



- 胞膜最终将凋亡细胞遗骸分割包裹为几个凋亡小体，凋亡小体可迅速被周围吞噬细胞吞噬

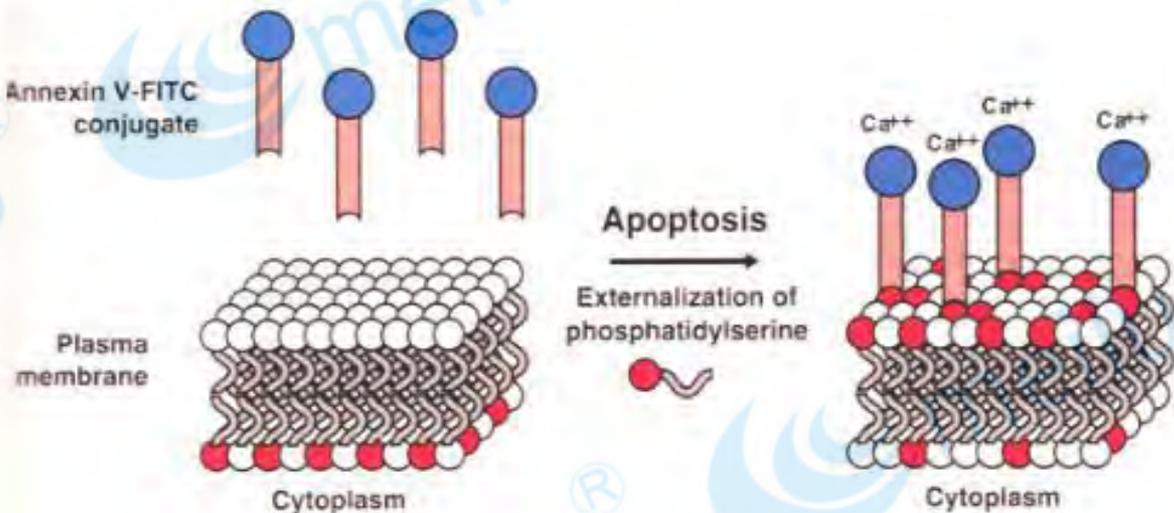


- **膜变化检测（早中期）**
(磷脂酰丝氨酸外翻检测、线粒体膜电位检测)
- **DNA片段化检测（晚期）**
(TUNEL)
- **Caspase活性检测（早中晚期）**
(Caspase活性检测试剂盒)
- **细胞形态学检测（早中晚期）**
(Hoechst 33342、Hoechst 33258、DAPI)



1. 磷酸酰丝氨酸外翻检测

细胞凋亡早期特征之一：磷脂酰丝氨酸（**phosphatidyl serine, PS**）从细胞膜内转移到细胞膜外，使**PS**暴露在细胞膜外表面。细胞凋亡处于早期阶段时，仅有**PS**外翻，而细胞膜仍然完整，随着凋亡进程的推移，细胞除了**PS**外翻以外，细胞膜通透性会改变。

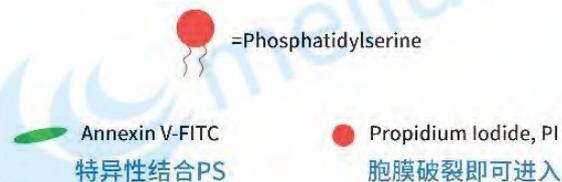
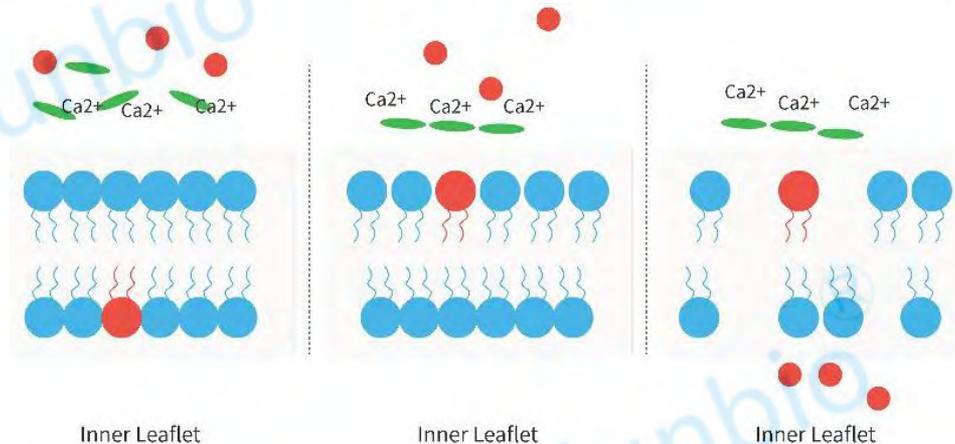


- **人膜联蛋白V (Annexin V)** 是一种**钙离子**依赖的**磷脂结合蛋白**，与**磷脂酰丝氨酸**具有**高度亲和力**。
- 将Annexin V进行荧光素 (FITC) 标记，以**Annexin V-FITC**作为荧光探针，特异性结合外翻的PS后将细胞膜染上绿色荧光。
- **碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI)** 是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但可以穿透坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞。因此将**Annexin V**与**PI**联合使用，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。
- **binding buffer**: 提供钙离子环境。在钙离子环境下，**Annexin V-FITC**能够与外翻的PS高度特异性结合，从而标记凋亡细胞，再搭配只能够进入受损细胞膜的**PI**，就可以达到区分各凋亡阶段细胞的目的了。

★ Annexin V/PI细胞凋亡检测试剂盒

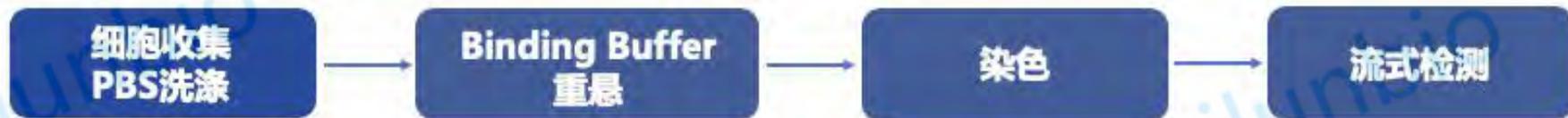
将Annexin V与PI联合使用，通过流式细胞仪检测可以将细胞分为四类：

- 正常活细胞 (Annexin V-/PI-)
- 早期凋亡细胞 (Annexin V+/PI-)
- 晚期凋亡细胞 (Annexin V+/PI+)
- 坏死细胞 (Annexin V-/PI+)



1. 细胞收集与染色——如何规范化操作？

- 如果是细胞样品，悬浮细胞直接计数，贴壁细胞使用不含EDTA的胰酶消化成细胞悬液后进行后续操作；
- 如果样本是组织，需要将其消化成细胞悬液才可以进行后续的实验步骤。



➤ 样品染色

1) 将 Binding Buffer (10×) 稀释成 1× Binding buffer 工作液备用 (1ml Binding Buffer (10×) 需加入 9ml 无菌去离子水)。

2) 对于悬浮细胞, 500-1000g 离心 5min 收集细胞。

对于贴壁细胞, 要用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 胰酶消化时间不宜过长或过短, 最好是在轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时, 加入细胞培养液, 将细胞轻轻吹打下来, 转移到离心管内, 500-1000g 离心 5min 收集细胞。

3) 收集细胞后, 加入预冷 PBS 溶液轻摇或用移液器轻柔吹打洗涤, 离心收集细胞, 共洗涤两次。

4) 在细胞沉淀中加入 1× Binding buffer 工作液, 重悬细胞, 使细胞浓度达到 1×10^6 cell/ml。

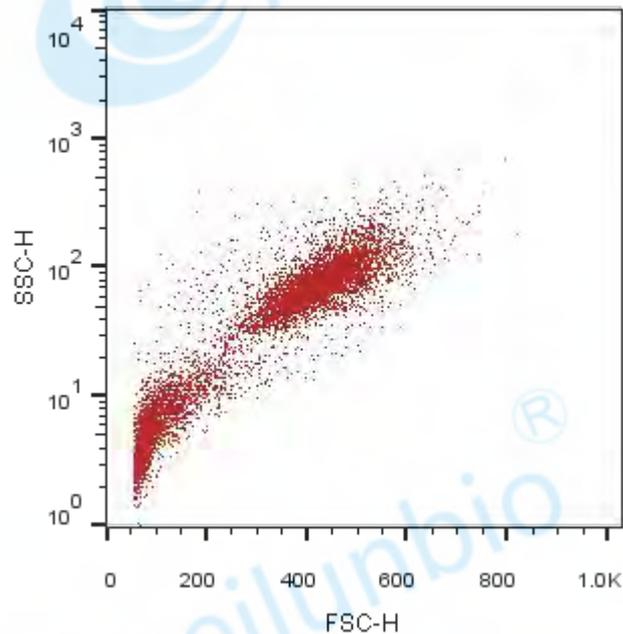
5) 吸取 100 μ l 细胞悬液 (细胞总数为 1×10^5 cell) 至一新管中, 加入 5 μ l Annexin V 和 5-10 μ l PI, 轻轻混匀, 室温避光孵育 15min。

2. 实验设计——对照组该如何设置？

- **空白对照**：不进行染色的裸细胞，一般选用待测 实验组 细胞。目的是看经处理后，细胞本身物理状态是否有变化，也用以进行细胞选群和阴性细胞大致位置的确定。
- **阴性对照**：双染的不处理正常细胞，目的是排除细胞自身凋亡以及因操作过程带来的凋亡和坏死。另外，健康细胞分界线的确定建议用这个对照，因为双染相对于不染会存在一定的荧光偏移。
- **单标组**：单一染料标记的实验组细胞（有凋亡细胞）。这一个组别主要是用来进行荧光补偿的调节。流式检测中，荧光信号除了接收通道以外，还可能被另一通道接收到，影响该通道的数据，因此需要进行“补偿调节”，扣除该染料对其他荧光通道的影响。单标组有几种染料就应该做几管，所使用样本应该是该染料检测时，细胞能够有明显区分度的样本。

3. 数据分析——流式结果要如何分析？

■ **流式分析的检测原理：**流式细胞仪通道中一个个的样品流过，仪器会给它一个激发光，这个样品给出的发射光被流式的不同通道所接收，反映在散点图上就是一个一个小点。流式通道一个个通过去的样品，不一定全是细胞，体系内的细胞碎片，各种小分子杂质只要能够被流式检测到，反映在图谱上，就是一个点。所以严格来说，流式图谱中的点，每个点代表的都是一个事件。一般分析我们建议上机时至少采集10000个事件，我们认为这个能够满足统计学样本分析量的基本要求的。



■ 凋亡数据分析有三个重要步骤:

画门 (圈细胞群)

调补偿

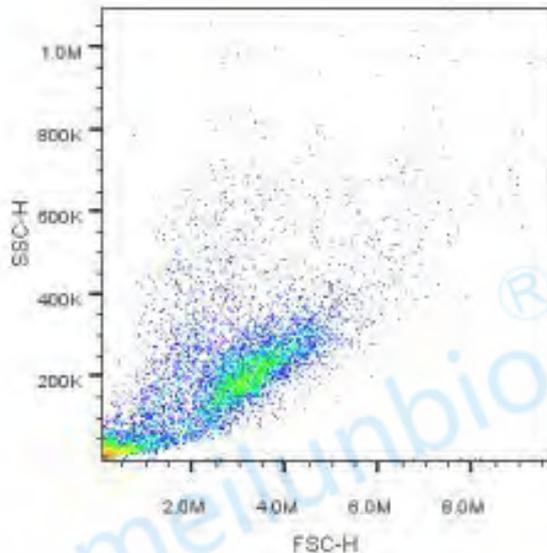
画十字门[®]



画门（圈细胞群）

——FSC-SSC物理图谱

横纵坐标轴**FSC**（前向角散射）和**SSC**（侧向角散射）分别代表了细胞大小和细胞颗粒度。通过这个图谱，我们能根据细胞大小、颗粒度做一个分类。这个分类有两个作用，一是如果两种细胞群在一起，细胞有明显的形态区别，可以做初步的分类，另一个重要作用是可以区分细胞与细胞碎片。被判定为细胞碎片的群，是必须在后续分析中排除出去的。

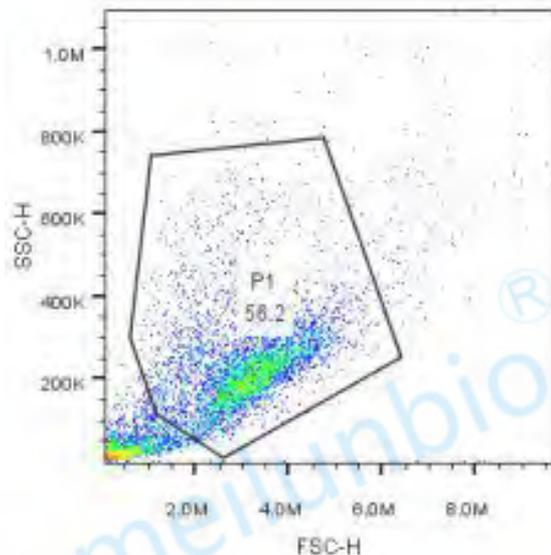




画门（圈细胞群）

——FSC-SSC物理图谱

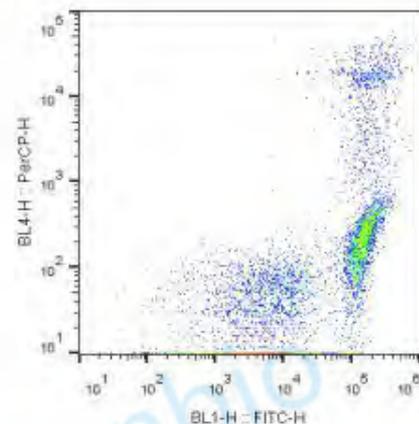
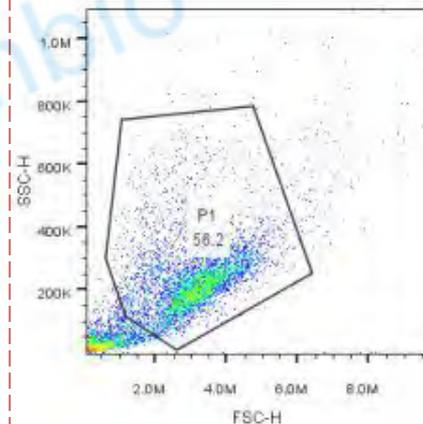
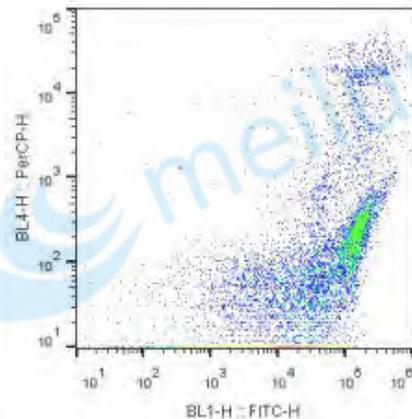
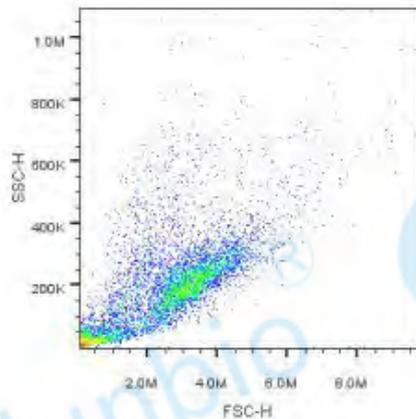
横纵坐标轴**FSC**（前向角散射）和**SSC**（侧向角散射）分别代表了细胞大小和细胞颗粒度。通过这个图谱，我们能根据细胞大小、颗粒度做一个分类。这个分类有两个作用，一是如果两种细胞群在一起，细胞有明显的形态区别，可以做初步的分类，另一个重要作用是可以区分细胞与细胞碎片。被判定为细胞碎片的群，是必须在后续分析中排除出去的。





画门 (圈细胞群)

——FSC-SSC物理图谱





调补偿

——用单标组数据补偿

必须调节补偿，细胞被激发出来的荧光除了被设置的那个接收通道接收以外，还有一部分光会逸散到其他通道当中。



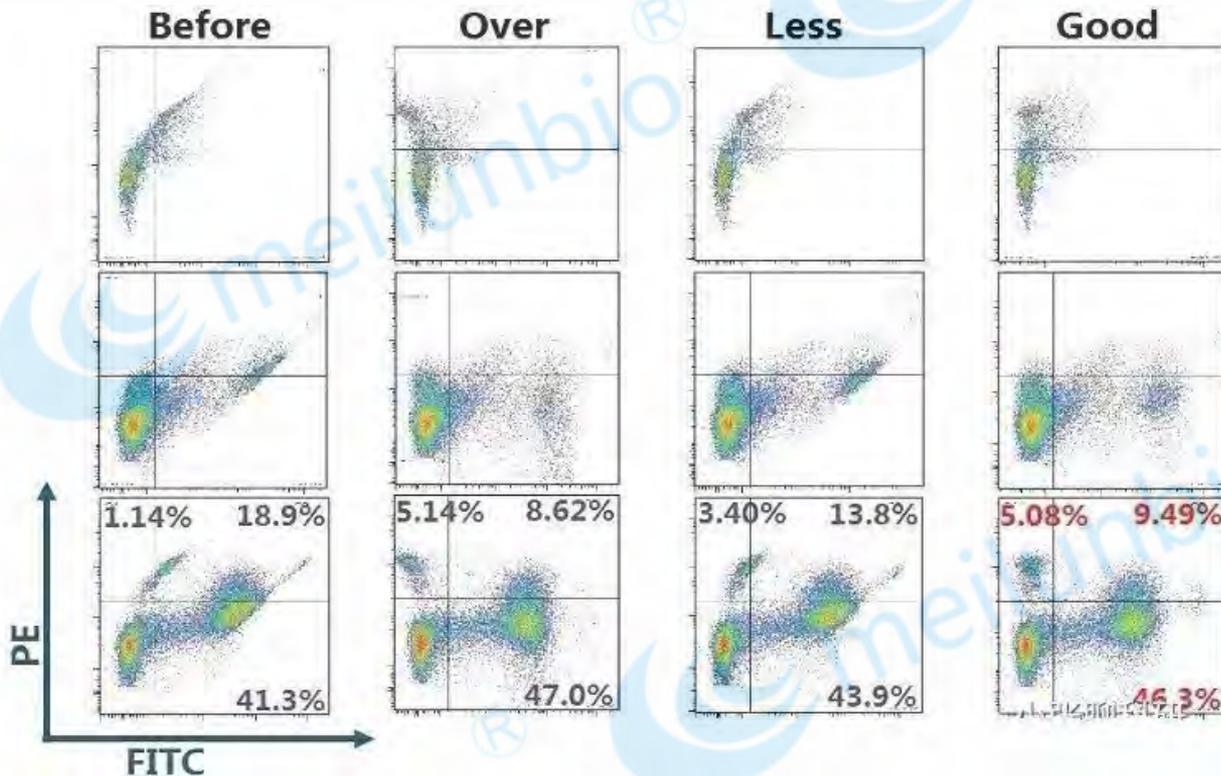
调补偿

补偿后：横平竖直！

PE单染管

FITC单染管

样品管





画十字门

——双色散点图

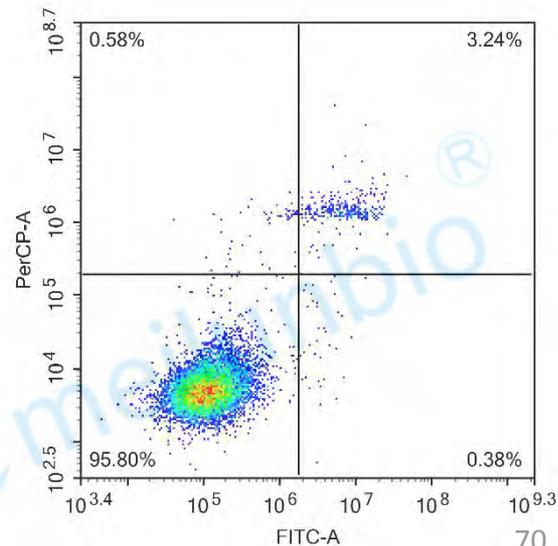
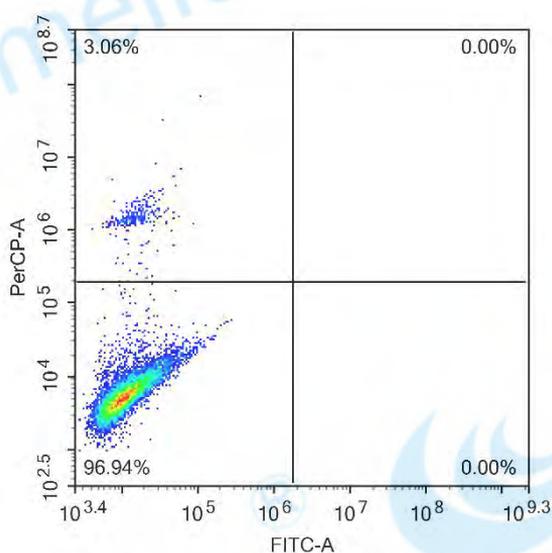
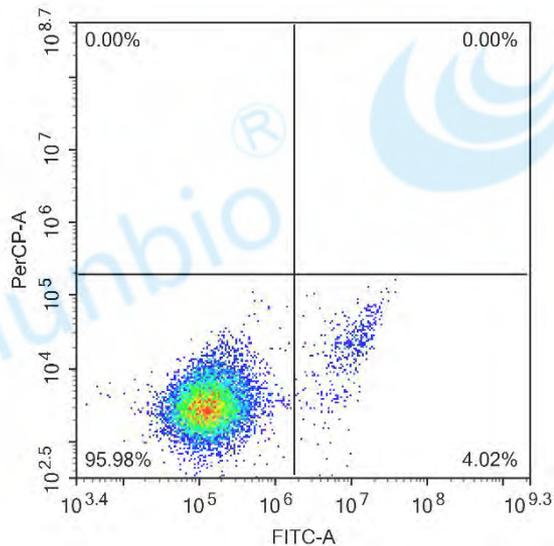




画十字门

——双色散点图

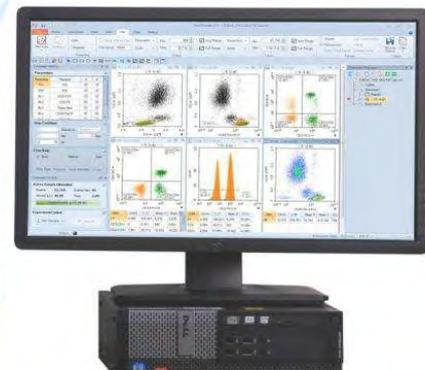
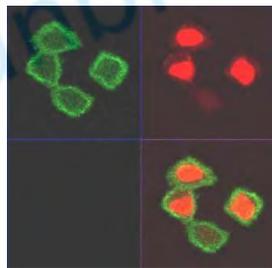
十字门的画法：调节好补偿后，找出两个单染组，然后根据单染组的分群大致画出横纵坐标轴的荧光强度分界，然后在双染的数据中以这两个分界为基准，结合数据的实际分群情况进行微调。需要一起分析的数据们，都必须用统一的十字门。



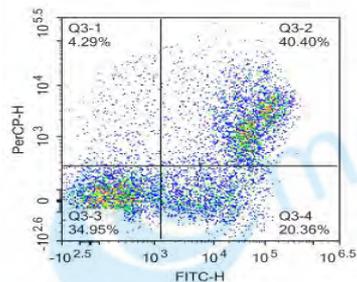
检测仪器



荧光显微镜



流式细胞仪



Hela 细胞用 50 μ M 凋亡激活剂 2 作用 4h 后采用流式细胞仪检测凋亡结果。

C6 细胞用 100 μ M 凋亡激活剂 2 作用 1.5h 后采用流式细胞仪检测凋亡结果。

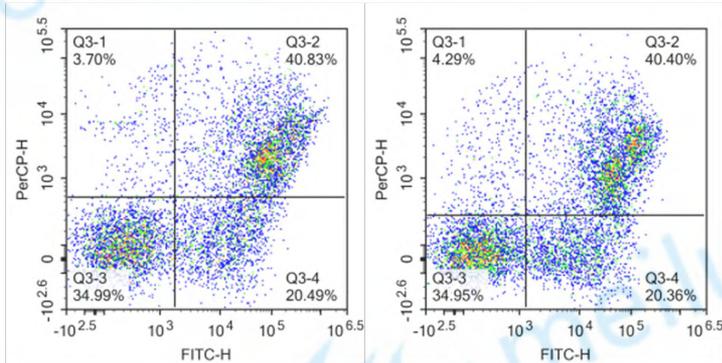


图 1. 进口试剂盒

图 2. 美仑试剂盒

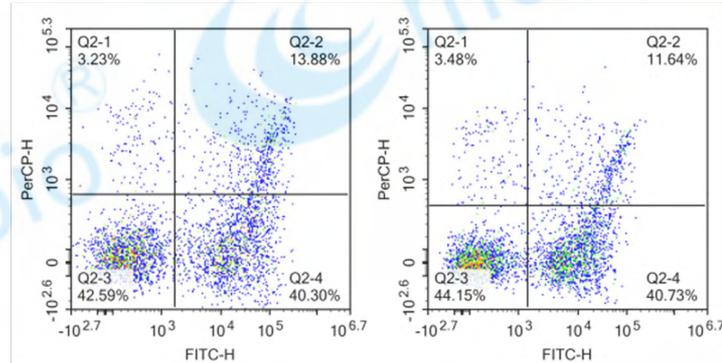
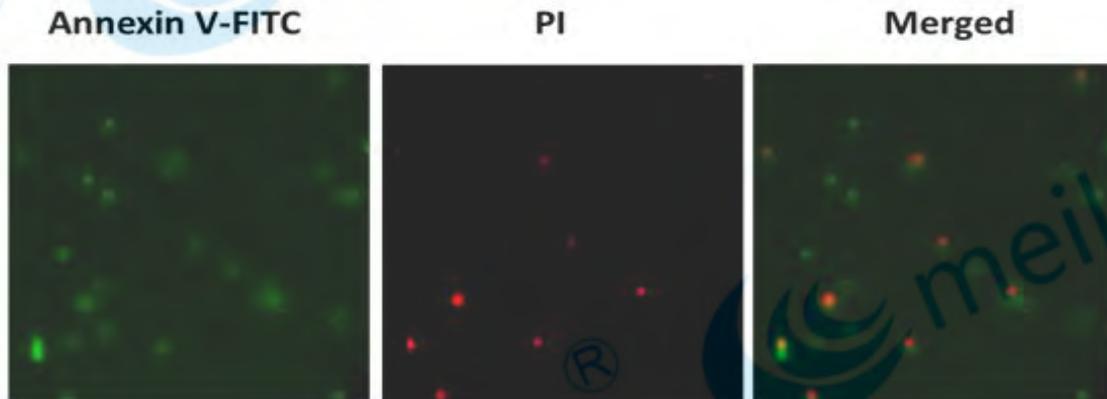


图 1. 进口试剂盒

图 2. 美仑试剂盒

结果:



2. 线粒体膜电位检测

线粒体在细胞凋亡的过程中起着枢纽作用，多种细胞凋亡刺激因子均可诱导不同的细胞发生凋亡，而线粒体跨膜电位 ($\Delta\psi$) 的下降，被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件，它发生在细胞核凋亡特征（染色质浓缩、DNA断裂）出现之前，一旦线粒体膜电位DYmt崩溃，则细胞凋亡不可逆转。

线粒体跨膜电位的存在，使一些亲脂性阳离子荧光染料如Rhodamine 123、Tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide[JC-1]、JC-10等可结合到线粒体基质，其荧光的增强或减弱说明线粒体内膜电负性的增高或降低，配合壬基吡啶橙(NAO)使用还可以检测线粒体膜的完整性。



➤ 线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)

(Meilunbio®货号：MA0338)

JC-1是一种广泛用于检测线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的理想荧光探针。线粒体膜电位的丧失被认为是细胞凋亡的早期事件。线粒体对JC-1的摄取可作为凋亡细胞和正常细胞的有效区分。线粒体膜电位较高时，JC-1以聚合物(J-aggregates)形式存在于线粒体基质中，产生红色荧光。线粒体膜电位较低时，JC-1不能聚集在线粒体中，而是以单体(monomer)形式弥散在整个细胞中，产生绿色荧光。因此荧光颜色的转变反映了线粒体膜电位的变化。通常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。

JC-1单体的最大激发波长为514nm，最大发射波长为**529nm**；

JC-1聚合物的最大激发波长为585nm，最大发射波长为**590nm**。

操作步骤

1. JC-1 染色工作液的配制:

六孔板每孔所需 JC-1 染色工作液的量为 1ml，其它培养器皿的 JC-1 染色工作液的用量以此类推；对于细胞悬液每 50-100 万细胞需 0.5ml JC-1 染色工作液。取适量 JC-1(200X)，按照每 50 μ l JC-1(200X)加入 8ml 超纯水的比例稀释 JC-1。剧烈 Vortex 充分溶解并混匀 JC-1，可以再室温放置 1-2 分钟以确保 JC-1 完全溶解。然后再加入 2ml JC-1 染色缓冲液(5X)，混匀后即为 JC-1 染色工作液。

2. 阳性对照的设置:

把试剂盒中提供的 CCCP(10mM)根据细胞不同推荐按照 1:1000~1:100 的比例加入到细胞培养液中稀释，处理细胞 20 分钟。随后按照下述方法装载 JC-1，进行线粒体膜电位的检测。对于大多数细胞，通常 10 μ M CCCP 处理 20 分钟后线粒体膜电位会完全丧失，JC-1 染色后观察应呈绿色荧光；而正常的细胞经 JC-1 染色后应显示红色荧光。CCCP 可以与 JC-1 同时添加，但是对于特定的细胞，CCCP 的作用浓度和作用时间可能会有所不同，需自行参考相关文献资料确定。

3. 对于悬浮细胞：

- 1) 取 10-60 万细胞，重悬于 0.5ml 细胞培养液中，细胞培养液中可以含血清和酚红。
- 2) 加入 0.5ml JC-1 染色工作液，颠倒数次混匀。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 分钟。
- 3) 在孵育期间，按照每 1ml JC-1 染色缓冲液(5X)加入 4ml 超纯水的比例，配制适量的 JC-1 染色缓冲液(1X)，并放置于冰浴。
- 4) 37°C 孵育结束后，600g 4°C 离心 3-4 分钟，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。
- 5) 用事先冰浴的 JC-1 染色缓冲液(1X)洗涤 2 次：加入 1ml JC-1 染色缓冲液(1X)重悬细胞，600g 4°C 离心 3-4 分钟，沉淀细胞，弃上清。重复一次。
- 6) 清洗两次后，用适量 JC-1 染色缓冲液(1X)重悬，使用流式细胞仪分析，也可用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜进行观察。

4. 对于贴壁细胞：

注意：对于贴壁细胞，如果希望采用流式细胞仪检测，可以先收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

- 1) 对于六孔板的一个孔，吸除细胞培养液，如有必要可以用 PBS 或其它适当溶液洗涤细胞一次，加入 1ml 细胞培养液。细胞培养液中可以含有血清和酚红。
- 2) 加入 1ml JC-1 染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 分钟。
- 3) 在孵育期间，按照每 1ml JC-1 染色缓冲液(5X)加入 4ml 超纯水的比例，配制适量的 JC-1 染色缓冲液(1X)，并放置于冰浴。
- 4) 37°C 孵育结束后，吸除上清，用事先冰浴的 JC-1 染色缓冲液(1X)洗涤 2 次。
- 5) 加入 2ml 细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。
- 6) 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

5. 对于纯化的线粒体：

- 1) 把配制好的 JC-1 染色工作液再用 JC-1 染色缓冲液(1X)稀释 5 倍。
- 2) 0.9ml 5 倍稀释的 JC-1 染色工作液中加入 0.1ml 总蛋白量为 10-100 μ g 纯化的线粒体。
- 3) 用荧光分光光度计或荧光酶标仪检测：混匀后直接用荧光分光光度计进行时间扫描(time scan)，激发波长为 485nm，发射波长为 590nm。如果使用荧光酶标仪，激发波长不能设置为 485nm 时，可以在 475-520nm 范围内设置激发波长。另外，也可以参考下面步骤 6 中的波长设置进行荧光检测。
- 4) 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察：方法同下面的步骤 6。

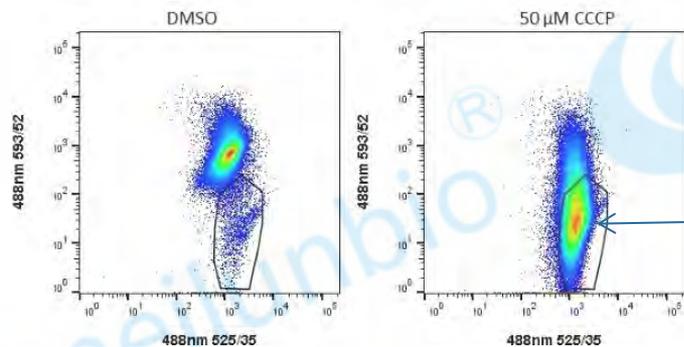
6. 荧光观测和结果分析：

检测 JC-1 单体时可以把激发光设置为 490nm，发射光设置为 530nm；检测 JC-1 聚合物时，可以把激发光设置为 525nm，发射光设置为 590nm。注意：此处测定荧光时不必把激发光和发射光设置在最大激发波长和最大发射波长。

如使用荧光显微镜观察，检测 JC-1 单体时可以参考观察其它绿色荧光时的设置，如观察 GFP 或 FITC 时的设置；检测 JC-1 聚合物时可以参考观察其它红色荧光，如碘化丙啶或 Cy3 时的设置。出现绿色荧光说明线粒体膜电位下降，并且该细胞很可能处于细胞凋亡早期。出现红色荧光说明线粒体膜电位比较正常，细胞的状态也比较正常。



流式结果：



膜电位下降

荧光显微镜结果：

