

细胞死亡定性检测

张海涛, 李兴旺, 袁猛*

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: myuan@mail.hzau.cn

引用格式: 张海涛, 李兴旺, 袁猛. (2018). 细胞死亡定性检测. *Bio-101* e1010171. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010171.

一般认为, 细胞死亡有两种类型, 细胞凋亡和坏死。细胞凋亡是正常生理过程中, 细胞受到自身基因调控或者蛋白作用而产生的自主死亡。而坏死多是物理或者化学的诱因作用于细胞之后, 达到一定强度或者时间引起的细胞剧烈变化。目前, 很多研究发现, 细胞体内生理活动或基因表达紊乱, 也会产生坏死。电镜观察是研究细胞死亡的重要手段。这里介绍比较简单的检测方法, 台酚蓝染色和紫外观察。

关键词: 细胞死亡, 凋亡, 坏死, 台酚蓝染色

方法一: 台酚蓝染色

实验原理: 台酚蓝也被叫做台盼蓝(Trypan Blue), 是检测细胞膜完整性最常用的生物染色试剂。健康的正常细胞能够排斥台酚蓝; 而死亡的细胞, 细胞膜完整性丧失, 通透性增加, 细胞可被台酚蓝染成蓝色。依据此原理, 样品经台盼蓝染色和脱色后, 可通过显微镜观察判断细胞死亡的情况。

实验目的: 检测样品细胞死亡。

材料与试剂

1. 离心管
2. 台酚蓝染色液(100 ml) (见溶液配方)
3. 脱色液(100 ml) (见溶液配方)

仪器设备

1. 剪刀

2. 真空干燥箱
3. 水浴锅
4. 体视显微镜
5. 照相机

实验步骤

1. 取活体水稻叶片(或其它部位样品;可用水保持其存活状态),将其剪成合适大小,浸泡在台酚蓝染色液中(由于后续需要加热,可以使用 10 ml 或 50 ml 离心管操作)。
2. 用真空干燥箱处理,排出空气,使叶片全部浸入染液。
3. 取出离心管,置于 100 °C 水浴锅中煮沸 2 分钟。
4. 取出离心管,置于室温染色过夜。
5. 将样品取出,以脱色液脱色三次,每次约 24 小时(可以视脱色情况改动次数和时间)。脱色至对照叶片蓝色褪去,呈浅蓝色或泛白色。
6. 在体视显微镜下观察,拍照(注意应使用体视显微镜底部的光源,便于观察,效果更好)。死亡的细胞会被染成深蓝色,而正常的细胞几乎观察不到染色。

结果与分析

- 1 超量表达 *NRKe* 和 *9RKe* 基因产生假病斑的台酚蓝染色结果(图 1)。肉眼观察到的假病斑部分实际上处于细胞死亡的晚期或者更晚,所以不会被染上色,呈褐色。但是在这些细胞周围,一些细胞正在发生细胞死亡,所以可以看到在假病斑附近有许多深蓝色的点。野生型水稻叶片没有发生细胞死亡,没有深蓝色的点(Zhang 等, 2011)。

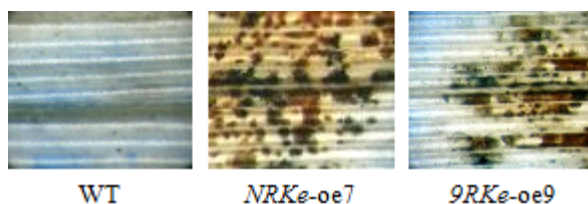


图 1. 超量表达 *NRKe* 和 *9RKe* 基因产生假病斑的台酚蓝染色

注意事项

对于坏死型细胞死亡，应注意细胞死亡的时空特点。细胞坏死是一个有限的过程，如果引起坏死的诱因失去，细胞坏死过程结束，使用台酚蓝染色可能不会得到结果。个人认为台酚蓝染色对于检测正在发生中的细胞死亡现象比较适合。

溶液配方

1. 台酚蓝染色液(100 ml)

台酚蓝	250 mg
乳酸	25 ml
水饱和酚	23 ml
甘油	25 ml
补 ddH ₂ O 至	100 ml

2. 脱色液(100 ml)

水合氯醛	250 g
补 ddH ₂ O 定容至	100 ml (提示：水合氯醛占的体积很大，定容前少加水)

方法二：紫外观察

实验原理：植物细胞在发生坏死的过程中，位于植物细胞内的多酚氧化酶会被激活，催化酚类形成多酚类物质。多酚类物质对紫外线有吸收，可以发出荧光。这样通过紫外线照射，观察有无荧光出现，可以判断细胞死亡的情况。

实验目的：检测样品细胞死亡。

材料与试剂

1. 活体叶片

仪器设备

- 1 紫外体视显微镜
- 2 照相机

实验步骤

1. 取活体叶片 (注意应以水保持存活的状态)。
2. 在紫外体视显微镜下, 以紫外光照射叶片上待检测部位(不要用底部光源), 观察照相。

结果与分析

超量表达 *NRKe* 和 *9RKe* 基因产生的假病斑在紫外光下观察的结果(图 2)。假病斑产生的部位由于多酚类物质的积累, 在紫外光照射下产生荧光。野生型水稻叶片不会产生荧光。

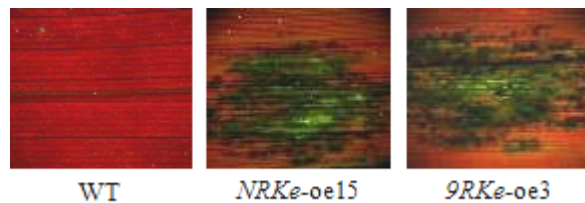


图 2. 超量表达 *NRKe* 和 *9RKe* 基因产生的假病斑在紫外光下的观察

注意事项

紫外线对植物细胞有诱发细胞坏死的作用, 所以这一检测过程需要尽量减少水稻叶片在紫外线下照射的时间(一般不要超过半分钟)。在此特别指出, 如果紫外线照射时间过长, 即使是野生型正常生理状态的叶片也会受此刺激产生荧光。所以, 为了能使试验顺利完成, 在开始的时候最好使用多余的叶片对目镜的焦距和照相机的焦距进行提前设定。

参考文献

1. Zhang, H., Cao, Y., Zhao, J., Li, X., Xiao, J. and Wang, S. (2011). [A pair of orthologs of a leucine-rich repeat receptor kinase-like disease resistance gene family regulates rice response to raised temperature](#). *BMC Plant Biol* 11: 160.