

3.1.1 形态学观察（Hoechst染色）

1.样本

取出加药处理后的细胞培养板，吸弃细胞培养液，PBS洗2次



2.固定

4%多聚甲醛固定15 min，PBS洗涤3×5 min



3.染色

加入Hoechst工作液完全覆盖细胞，37 °C避光孵育20 min



4.洗涤

吸弃染色液，PBS洗涤3×5 min



5.观察

往细胞培养板中加入少量PBS，置于荧光显微镜下观察并拍照

常见问题解析

1. 整个背景荧光强怎么办？

①优化染料浓度和作用时间；②增加洗涤次数和强度，确保充分洗涤，避免染料残留。

2. 荧光信号弱或未见明显荧光，怎么办？

①增加染料浓度或作用时间；②染料现配现用，使用新鲜配制的染料；③检查显微镜设置（滤光片、光闸、光路）；④避免过度洗涤，导致弱染色的凋亡早期细胞或使贴壁细胞脱落。

3. 如何确保荧光定量的准确性？

①采用盲法计数；②随机选取多个代表性视野；③保证细胞铺板均匀；④利用图像分析软件辅助计数（需设定准确的形态学阈值）。

4. 如何区分细胞凋亡和坏死？

区别	凋亡	坏死
起因	生理性或病理性	病理性变化或剧烈损伤
累及细胞	单个散在细胞	大片组织或成群细胞
细胞膜	保持完整，一直到形成凋亡小体	破损
染色质	凝聚在核膜下呈半月状	呈絮状
细胞器	无明显变化	肿胀、内质网崩解
细胞体积	固缩变小	肿胀变大
凋亡小体	有，被邻近细胞或巨噬细胞吞噬	无，细胞自溶，残余碎片被巨噬细胞吞噬
基因组DNA	有控降解，电泳图谱呈梯状	随机降解，电泳图谱呈涂抹状
蛋白质合成	有	无
调节过程	受基因调控	被动进行
炎症反应	无，不释放细胞内容物	有，释放内容物

3.1.2 Annexin V/PI染色流式细胞术检测细胞凋亡

1.样本

收集细胞（约 1×10^5 - 1×10^6 个/管），用预冷的PBS洗2次



2.重悬

弃上清，用预冷 $1 \times$ Annexin V结合缓冲液重悬细胞



3.染色

3.1 加入Annexin V-荧光染料，混匀后室温避光孵育15 min
3.2 孵育结束后立即加入PI溶液



4.稀释

加入预冷的 $1 \times$ Annexin V结合缓冲液稀释细胞悬液



5.上机

染色完成后1 h内进行流式细胞分析，设置激发波长和发射波长

常见问题解析

1. 空白组有荧光信号怎么办？

①彻底清洗仪器；②空白组应选用状态良好的正常细胞，如细胞状态太差无法恢复或存在污染，应及时更换细胞。

2. 坏死细胞比例过高，如何处理？

①缩短凋亡诱导时间；②降低PI浓度（建议20-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），严格计时；③更换新鲜培养基，检查细胞状态。

3.1.3 TUNEL检测细胞凋亡

1.样本

取出加药处理后的细胞培养板，吸弃细胞培养液，PBS洗2次



2.固定

4%多聚甲醛固定15 min，PBS洗涤3×5 min



3.通透

滴加0.2% Triton X-100覆盖细胞，室温孵育10 min



4.平衡

4.1 吸弃平衡液，加TUNEL标记工作液，37°C避光孵育60 min
4.2 PBS洗4×5 min（避光）



5.染核

5.1 滴加DAPI工作液覆盖细胞，室温避光孵育5 min
5.2 PBS洗3×3 min（避光）



6.观察

往细胞培养板中加入少量PBS，置于荧光显微镜下观察并拍照

常见问题解析

1. 背景过高，存在非特异性染色怎么办？

①增加PBS洗涤次数（ ≥ 5 次，每次5 min），震荡洗涤效果更佳；②降低Triton浓度或缩短时间。

2. 信号弱或无信号，怎么处理？

①缩短固定时间，避免使用醇类固定剂；②增加Triton X-100浓度（0.5%~1%）或延长通透时间，冰上操作防细胞脱落；③延长孵育时间至90-120 min。

参考文献

- [1]Moyer A, Tanaka K, Cheng EH. Apoptosis in Cancer Biology and Therapy [J]. Annu Rev Pathol, 2025, 20(1): 303-328.
- [2]Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis [J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(3): 528-537.
- [3]Guo M, Lu B, Gan J, et al. Apoptosis detection: a purpose-dependent approach selection [J]. Cell Cycle, 2021, 20(11): 1033-1040.
- [4]Doan P, Musa A, Murugesan A, et al. Glioblastoma Multiforme Stem Cell Cycle Arrest by Alkylaminophenol Through the Modulation of EGFR and CSC Signaling Pathways [J]. Cells, 2020, 9(3).