

3.3.1 形态学观察（TEM）

1.样本

离心收集细胞，立即用预冷戊二醛固定（1-2 h）



2.清洗

PBS洗4次×10 min，去除戊二醛



3.后固定

四氧化锇（OsO₄）避光固定1 h（通风橱操作）



4.清洗

PBS洗4次×10 min，去除OsO₄



5.脱水

30%→50%→70%→80%→90%→95%→100%→100%乙醇各15 min



6.渗透

6.1 无水乙醇：树脂混合液（1:1→1:2）渗透各1 h
6.2 纯树脂渗透（更换3次，每次2 h）
6.3 包埋模具聚合（60° C，48 h）



7.切片

切60 nm切片，捞至铜网



8.染色

8.1 醋酸铀酰染色20 min→蒸馏水洗净
8.2 柠檬酸铅染色6 min（无CO₂环境）→彻底水洗



9.观察

找坏死性凋亡细胞的典型超微结构特征并拍照

常见问题解析

1. 切片上有黑色颗粒状污染物怎么办？

①使用新鲜过滤的染液；②铅染后务必快速彻底清洗；③保持操作环境清洁；④确保OsO₄固定后充分清洗；⑤检查缓冲液pH和浓度。

2. 切片碎裂或产生空洞怎么办？

①确保梯度脱水彻底，尤其最后两次100 %脱水剂；②延长渗透时间，保证树脂完全置换脱水剂；③严格按照说明配制和聚合树脂。

3. 膜结构不清晰（反差弱），如何处理？

①确保使用有效OsO₄并固定足够时间；②优化铀、铅染色时间和浓度；③适当增加切片厚度；确保染色步骤正确执行。

3.3.2 免疫沉淀检测坏死体形成

1. 诱导

细胞达70-90%汇合，实验组用TNF α +Smac mimetic+zVAD诱导坏死性凋亡，设未处理及溶剂对照

2. 裂解

冰上PBS洗，非变性裂解缓冲液裂解，离心取上清，留Input

3. 预清除

总裂解液 + 无关IgG + 珠子 \rightarrow 孵育 \rightarrow 取上清

4. IP

裂解液分三份：+ 特异抗体 / + 无关IgG / 不加抗体 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C过夜孵育 \rightarrow + 珠子 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C孵育1.5 h。

5. 洗涤

冰上洗涤珠子 5次

6. 洗脱

SDS上样缓冲液重悬，煮沸 \rightarrow 取上清（IP产物）

7. WB

WB检测Input及各IP产物

常见问题解析

1. IP产物中检测不到相互作用的蛋白（如IP RIPK3后Western Blot检测不到MLKL），怎么办？

①验证诱导与表达：预实验确定最佳药物浓度、组合和处理时间（通过细胞死亡、PI染色、p-MLKL Western Blot验证）；使用已知对坏死性凋亡敏感的细胞（如L929，HT-29，Jurkat等），并通过Western Blot验证RIPK3/MLKL基础表达。

②优化裂解条件：使用温和非变性裂解液，缩短裂解时间，必须包含强效磷酸酶抑制剂混合物和蛋白酶抑制剂，现用现加。

③解决抗体问题：选择文献报道或供应商标明已验证用于IP的抗RIPK3/MLKL抗体。用Input样品做WB验证抗体有效性；使用与IP抗体不同宿主种属或识别不同表位的WB抗体并尝试多个抗体；增加IP抗体用量（2-10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ lysate），延长抗体与裂解液孵育时间（4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜）。

④稳定复合物：裂解、离心、IP步骤在冰上快速进行，谨慎优化使用可逆交联剂，处理活细胞或裂解液后再IP（需额外优化和对照）。

2. Input样品中目标蛋白信号弱或无，怎么办？

①增加裂解液体积或时间（权衡复合物稳定性）；②确保全程冰上即4 $^{\circ}\text{C}$ 操作，使用新鲜足量抑制剂；③用内参（ β -Actin）验证Input质量和上样量，排查Western Blot步骤；④Western Blot确认细胞表达目标蛋白。

参考文献

- [1]Wang F, Zhou F, Peng J, et al. Macrophage Tim-3 maintains intestinal homeostasis in DSS-induced colitis by suppressing neutrophil necroptosis [J]. Redox Biol, 2024, 70: 103072.
- [2]Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death [J]. Apoptosis, 2017, 22(2): 306-323.