

3.2.1 形态学观察（SEM）

1. 固定

- 1.1 收集细胞，用预冷2.5%戊二醛固定3 h
- 1.2 PBS漂洗 3×10 min

2. 脱水

- 2.1 乙醇（30%→50%→70%→90%→100%）各浸泡15 min
- 2.2 100%乙醇重复3次

3. 干燥

临界点干燥法

4. 镀膜

离子溅射仪镀5-10 nm金/铂层

5. 观察

- 5.1 样品粘贴于导电胶带，放入样品台
- 5.2 设置好参数后，寻找区域并采集图像

常见问题解析

1. 膜结构模糊/孔洞不清，怎么办？

①减少镀膜厚度；②降低加速电压。

2. 出现“白色亮斑”覆盖表面怎么处理？

①增加镀膜均匀性；②缩短单次扫描时间。

3. 特征性结构气泡结构破裂怎么办？

缩短固定前时间间隔，诱导细胞焦亡后立即固定。

3.2.2 脂质体泄漏法检测GSDM介导的孔隙形成

1. 脂质薄膜制备

- 1.1 混合磷脂，旋转蒸发去除溶剂形成均匀脂质薄膜
- 1.2 真空干燥彻底除尽痕量溶剂

2. 多层囊泡生成

- 2.1 用含高浓度荧光染料的低盐缓冲液水化脂质薄膜
- 2.2 涡旋或超声处理形成多层囊泡

3. 脂质体均质化

将多层囊泡通过100 nm聚碳酸酯膜反复挤出，得粒径均一的小单层囊泡

4. 游离染料分离

- 4.1 超速离心分离小单层囊泡与未包封染料
- 4.2 用含盐检测缓冲液平衡及收集脂质体

5. 磷脂浓度定量

磷脂检测试剂盒测定脂质体终浓度

6. 荧光检测

- 6.1 预热荧光分光光度计，设定参数
- 6.2 检测稀释脂质体、阴性对照、阳性对照和实验组荧光值

7. 结果计算分析

- 7.1 计算泄漏百分比
- 7.2 绘制泄漏百分比-时间曲线评估动力学
- 7.3 通过泄漏百分比-蛋白浓度曲线计算 EC_{50}

常见问题解析

1. 阳性对照（Triton）泄漏达不到100%，怎么办？

①增加Triton X-100浓度，确保充分混匀；②降低脂质体浓度；③检查脂质体制备和纯化步骤。

2. 无泄漏信号或信号极弱，怎么办？

①验证蛋白活性；②增加蛋白浓度；③优化脂质成分；④优化缓冲液（pH，盐浓度）；⑤检查脂质体制备过程，确保无游离染料且稳定性好；⑥增加染料装载浓度；⑦延长孵育时间或进行实时监测。

3. 背景泄漏高（阴性对照泄漏明显），怎么办？

①优化脂质体制备流程（充分水化、挤出）；②增加色谱柱体积或离心次数/力以彻底去除游离染料；③确保检测缓冲液与脂质体外部缓冲液一致（特别是盐浓度）；④适当降低脂质体浓度。

参考文献

- [1]Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death [J]. Trends Microbiol, 2001, 9(3): 113-114.
- [2]Broz P. Pyroptosis: molecular mechanisms and roles in disease [J]. Cell Res, 2025, 35(5): 334-344.
- [3]Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(2): 99-109.
- [4]He WT, Wan H, Hu L, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion [J]. Cell Res, 2015, 25(12): 1285-1298.
- [5]Hu JJ, Liu X, Xia S, et al. FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation [J]. Nat Immunol, 2020, 21(7): 736-745.