

实验十

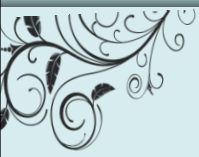
死活细胞的鉴定

生物学实验教学中心
邓为科



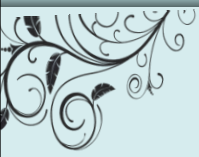
1、染色法：

分为化学染色法和荧光染色法，根据染色机理不同，染料或使死细胞着色，或使活细胞着色。死活细胞在生理机能和性质上的差异主要包括：



死活细胞细胞膜通透性的差异：活细胞的细胞膜是一种选择性膜，对细胞起保护和屏障作用，只允许物质选择性的通过。

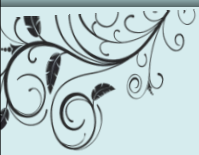
细胞死亡后，细胞膜受损，通透性增加。



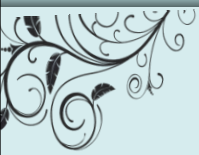
台盼蓝：阴离子型染料，不能透过完整的细胞膜。

死活细胞在代谢上的差异：

美蓝染料是一种无毒染料，氧化型为蓝色，还原型为无色。活细胞中新陈代谢作用，使细胞内具有较强的还原能力，使美蓝从蓝色氧化型变为无色还原性。

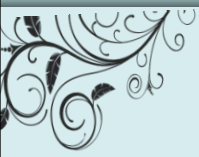


荧光素双醋酸酯（**FDA**）是一种常用的培养动植物细胞的生活力鉴定染料，染色机理：利用死活细胞在代谢上的差异。**FDA**本身不产生荧光，也无极性，能自由渗透出入完整的细胞膜。当**FDA**进入活细胞后，被细胞内的脂酶分解，生出有极性的、能产生荧光的物质（荧光素），该物质不能自由透过活细胞膜，积累在细胞膜内，因而使有活力的细胞产生绿色荧光，无活力的细胞不能使**FDA**分解，无法产生荧光。

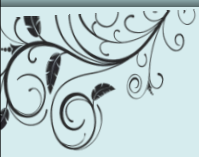


2、仪器分析法：全自动分析细胞计数仪和流式细胞仪，可对细胞的死活进行精确的批量检测。



德国INNOVATIS出产的全自动**Cedex**细胞存活率/细胞计数仪/细胞分析仪：是世界上第一台高分辨率、高清晰度扫描(专利)细胞分析仪，具有全自动台盼蓝染色、显微**CCD**成象、**CEDEX**工作站软件，可用于制药、医学、发酵、免疫、病理、毒性测试、生物技术等学科的研究开发和工业生产过程中的细胞计数和分析。



自动分析结果，检测分析数据输出（11项）：总细胞数目，总细胞浓度 (cells/mL)；活细胞数目，活细胞浓度 (cells/mL)；死细胞数目，死细胞浓度 (cells/mL)；细胞存活率 (%)；细胞的平均圆度 (compactness)；细胞的平均直径 (um)；细胞团比例 (Aggregate Rate)；

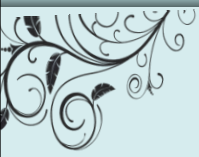


流式细胞仪法：用来判断细胞死活的常用荧光探针有两大类：一类是能透过活的细胞膜进入细胞内而发出荧光的物质，例如**FDA**可被活细胞滞留而发出黄绿色荧光，若细胞有损伤则会从细胞中流失，观察不到荧光。

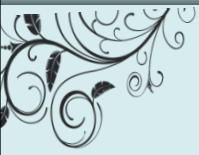


流式细胞仪法：另一类是不能透过活细胞膜，但能对固定的细胞及膜有破损的细胞的核进行染色，例如碘化丙啶

（ **PI, Propidium iodide** ）和溴化乙锭（ **EB, Ethidium bromide** ）就是常用的第二类荧光探针。碘化丙啶(**PI**)不能穿透细胞膜，对于具有完整细胞膜的正常细胞或凋亡细胞不能染色。而对于坏死细胞，其细胞膜的完整性丧失，碘化丙啶(**PI**)可以染色坏死细胞。目前常用的一种细胞凋亡与坏死检测试剂盒则含有**Hoechst 33342**和碘化丙啶(**Propidium Iodide, PI**)两种荧光染料。



细胞发生凋亡时，染色质会固缩，**Hoechst 33342**可以穿透细胞膜，染色后凋亡细胞荧光会比正常细胞明显增强。上述两种染料双染后，使用流式细胞仪或荧光显微镜检测时，正常细胞为弱红色荧光+弱蓝色荧光，凋亡细胞为弱红色荧光+强蓝色荧光，坏死细胞为强红色荧光+强蓝色荧光。



1、实验目的

掌握鉴定死活细胞的方法。

2、实验原理

台盼蓝是一种低毒的活体染色剂，它只能透过质膜受损的细胞或死亡的细胞，而正常的活细胞能加以排除，即：死细胞着色而活细胞不着色。故可用于死、活细胞的鉴定。



实验器材与材料：口腔黏膜上皮细胞、洋葱内表皮细胞。

试剂：0.2%台盼蓝溶液

实验步骤：用0.2%的台盼蓝染液1滴，滴加在载玻片的中央。

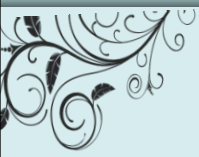
取洁净的牙签稍用力刮取口腔黏膜上皮细胞，均匀涂抹于台盼蓝染液中。

染色5-10分钟后进行观察。

实验器材与材料：口腔黏膜上皮细胞、洋葱内表皮细胞。

试剂：0.2%台盼蓝溶液

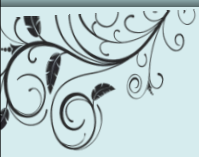
实验步骤：用0.2%的台盼蓝染液1滴，滴加在载玻片的中央。
取洁净的牙签稍用力刮取口腔黏膜上皮细胞，均匀涂抹于台盼蓝染液中。
染色5-10分钟后进行观察。



切取面积 0.5×0.5 平方厘米的洋葱内表皮，小心地平铺在载玻片的中央。

向载玻片中央的洋葱内表皮上滴加1滴台盼蓝染液。

染色5-10分钟后进行观察。



作业：

绘制口腔黏膜上皮细胞及洋葱内表皮细胞图。

思考：鉴定细胞死活可采用哪些方法？