

JC-1 实验报告

一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
青链霉素	合肥知恩生物	ZNCA-008
胰蛋白酶	合肥知恩生物	ZNCA-009
胎牛血清	合肥知恩生物	ZNCA-007
线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)	碧云天	C2006

二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
超净工作台	苏州安泰	SW-CJ-2FD
显微镜	江南永新	XD202
CO2 培养箱	Thermo	3111
流式细胞仪	BD	BD FACSCalibur
荧光显微镜	广州明美	MF52

三、实验方法 (参考试剂盒说明书)

1. JC-1 染色工作液的配制:

六孔板每孔所需 JC-1 染色工作液的量为 1ml, 其它培养器皿的 JC-1 染色工作液的用量以此类推; 对于细胞悬液每 50-100 万细胞需 0.5ml JC-1 染色工作液。取适量 JC-1(200X), 按照每 50 μ l JC-1(200X)加入 8ml 超纯水的比例稀释 JC-1。剧烈 Vortex 充分溶解并混匀 JC-1。然后再加入 2ml JC-1 染色缓冲液(5X), 混匀后即为 JC-1 染色工作液。

2. 阳性对照的设置:

把试剂盒中提供的 CCCP(10mM)推荐按照 1:1000 的比例加入到细胞培养液中, 稀释至 10 μ M, 处理细胞 20 分钟。随后按照下述方法装载 JC-1, 进行线粒体膜电位的检测。对于大多数细胞, 通常 10 μ M CCCP 处理 20 分钟后线粒体的膜电位会完全丧失, JC-1 染色后观察应呈绿色荧光; 而正常的细胞经 JC-1 染色后应显示红色荧光。对于特定的细胞, CCCP 的作用浓度和作用时间可能有所不同, 需自行参考相关文献资料确定。

3. 对于悬浮细胞:

- 取 10-60 万细胞, 重悬于 0.5ml 细胞培养液中, 细胞培养液中可以含血清和酚红。
- 加入 0.5ml JC-1 染色工作液, 颠倒数次混匀。细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。
- 在孵育期间, 按照每 1ml JC-1 染色缓冲液(5X)加入 4ml 蒸馏水的比例, 配制适量的 JC-1 染色缓冲液(1X), 并放置于冰浴。
- 37 $^{\circ}$ C 孵育结束后, 600g 4 $^{\circ}$ C 离心 3-4 分钟, 沉淀细胞。弃上清, 注意尽量不要吸除细胞。
- 用 JC-1 染色缓冲液(1X)洗涤 2 次: 加入 1ml JC-1 染色缓冲液(1X)重悬细胞, 600g 4 $^{\circ}$ C 离心 3-4 分钟, 沉淀细胞, 弃上清。再加入 1ml JC-1 染色缓冲液(1X)重悬细胞, 600g 4 $^{\circ}$ C 离心 3-4 分钟, 沉淀细胞, 弃上清。
- 再用适量 JC-1 染色缓冲液(1X)重悬后, 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察, 也可以用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

4. 对于贴壁细胞:

注意: 对于贴壁细胞, 如果希望采用荧光分光光度计或流式细胞仪检测, 可以先收集细胞, 重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

- a. 对于六孔板的一个孔, 吸除培养液, 根据具体实验如有必要可以用 PBS 或其它适当溶液洗涤细胞一次, 加入 1ml 细胞培养液。细胞培养液中可以含有血清和酚红。
- b. 加入 1ml JC-1 染色工作液, 充分混匀。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 分钟。
- c. 在孵育期间, 按照每 1ml JC-1 染色缓冲液(5X)加入 4ml 蒸馏水的比例, 配制适量的 JC-1 染色缓冲液(1X), 并放置于冰浴。
- d. 37°C 孵育结束后, 吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲液(1X)洗涤 2 次。
- e. 加入 2ml 细胞培养液, 培养液中可以含有血清和酚红。
- f. 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

5. 对于纯化的线粒体:

- a. 把配制好的 JC-1 染色工作液再用 JC-1 染色缓冲液(1X)稀释 5 倍。
- b. 0.9ml 5 倍稀释的 JC-1 染色工作液中加入 0.1ml 总蛋白量为 10-100 μ g 纯化的线粒体。
- c. 用荧光分光光度计或荧光酶标仪检测: 混匀后直接用荧光分光光度计进行时间扫描(time scan), 激发波长为 485nm, 发射波长为 590nm。如果使用荧光酶标仪, 激发波长不能设置为 485nm 时, 可以在 475-520nm 范围内设置激发波长。另外, 也可以参考下面步骤 6 中的波长设置进行荧光检测。
- d. 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察: 方法同下面的步骤 6。

6. 荧光观测和结果分析:

a. 检测 JC-1 单体时可以把激发光设置为 490nm, 发射光设置为 530nm; 检测 JC-1 聚合物时, 可以把激发光设置为 525nm, 发射光设置为 590nm。注意: 此处测定荧光时不必把激发光和发射光设置在最大激发波长和最大发射波长。如使用荧光显微镜观察, 检测 JC-1 单体时可以参考观察其它绿色荧光时的设置, 如观察 GFP 或 FITC 时的设置; 检测 JC-1 聚合物时可以参考观察其它红色荧光, 如碘化丙啶或 Cy3 时的设置。出现绿色荧光说明线粒体膜电位下降, 并且该细胞很可能处于细胞凋亡早期。出现红色荧光说明线粒体膜电位比较正常, 细胞的状态也比较正常。

注意事项:

- 1、JC-1(200X)在 4°C、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内, 可以 20-25°C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
- 2、必须先把 JC-1(200X)用试剂盒提供的超纯水充分溶解混匀后, 才可以加入 JC-1 染色缓冲液(5X)。不可先配制 JC-1 染色缓冲液(1X)再加入 JC-1(200X), 这样 JC-1 会很难充分溶解, 会严重影响后续的检测。
- 3、装载完 JC-1 后用 JC-1 染色缓冲液(1X)洗涤时, 使 JC-1 染色缓冲液(1X)保持 4°C 左右, 此时的洗涤效果较好。
- 4、JC-1 探针装载完并洗涤后尽量在 30 分钟内完成后续检测。在检测前需冰浴保存。
- 5、请勿把 JC-1 染色缓冲液(5X)全部配制成 JC-1 染色缓冲液(1X), 本试剂盒使用过程中需直接使用 JC-1 染色缓冲液(5X)。
- 6、如果发现 JC-1 染色缓冲液(5X)中有沉淀, 必须全部溶解后才能使用, 为促进溶解可以在 37°C 加热。
- 7、CCCP 为线粒体电子传递链抑制剂, 对人体有害, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 8、本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品,

不得存放于普通住宅内。

9、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。