



## 流式线粒体膜电位 JC-1 检测实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
离心机	恒诺仪器设备有限公司	2-16R
流式细胞仪	BD	Celesta
1.5mL 离心管	科兔生物	KTL-15-P
流式管	康宁	5ml

#### 2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
PBS	科兔生物	RG-CE-10
JC-1	Beyotime	C2003S

### 二、JC-1 实验步骤

#### 1. JC-1 染色工作液的配制：

6 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 5 $\mu$ l JC-1 (200X)加入 1ml JC-1 染色缓冲液的比例稀释 JC-1。使用移液器反复吹打，混匀后即为 JC-1 染色工作液。

#### 2.对于悬浮细胞：

a.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。

b.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。

c.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。

d.用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次：加入 1ml JC-1 染色缓冲液重悬细胞，600g 4 $^{\circ}$ C 离心 3-4 分钟，沉淀细胞，弃上清。再加入 1ml JC-1 染色缓冲液重悬细胞，600g 4 $^{\circ}$ C 离心 3-4 分钟，沉淀细胞，弃上清。



e.再用适量 JC-1 染色缓冲液重悬后,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。

### 3.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 6 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.37°C 孵育结束后,吸除上清,用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次。

d.加入 2ml 细胞培养液,培养液中可以含有血清和酚红。

e.荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

### 4.对于纯化的线粒体:

a.0.9ml JC-1 染色工作液中加入 0.1ml 总蛋白量为 10-100 $\mu$ g 纯化的线粒体。

b.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。

c.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。

## 三、流式检测

a.检测 JC-1 单体时可以把激发光波长设置为 490nm,发射光波长设置为 530nm;检测 JC-1 聚合物时,可以把激发光波长设置为 525nm,发射光波长设置为 590nm。

注意:此处测定荧光时不必把激发光和发射光波长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。

## 四、数据处理

检测完成后可以直接利用流式细胞仪自带软件处理数据,生成 PDF 文件,然后截屏需要



的流式细胞图,并对凋亡细胞比例进行统计分析;另外可以保存 FCS 文件,利用 Flowio 等流式数据处理软件对流式细胞图进行处理,如下图所示。

仅供科研用途,不可用于临床诊断!