



JC-1 实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo	4131
电热恒温水浴锅	恩谊	HH-48

2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
6 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-6
线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)	碧云天	C2006
12 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-0296-4
Hoechst 33342	碧云天	C1022

二、JC-1 实验步骤

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：

- 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. 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 $^{\circ}$ 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。
- e. 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。
- f. 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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：

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。

三、结果判读：

红光越强，线粒体膜电位越高；绿光越强，线粒体膜电位越低，线粒体损伤越重。

四、注意事项：

- 1、细胞状态要好
- 2、铺板密度要合适
- 3、加入试剂时应注意避光。染色后尽量减少强光照射，拍照前也不要长时间放在显微镜光源下。