**实验报告**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目名称：** | 细胞线粒体膜电位检测（JC-1法） |

|  |  |
| --- | --- |
| **委托方（甲方）：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **受托方（乙方）：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **日期：** | 年 月 日 |

# 1 实验信息

见实验方案

# 2 仪器、试剂与实验细胞系

## 2.1 主要仪器

**表1** 实验所用主要仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **型号** | **生产商** |
| 二氧化碳培养箱 | 3111 | Thermo |
| 全自动细胞计数仪 | Countess II | Thermo |
| 荧光倒置显微镜 | Ts2R-FL | NIKON |
| 成像系统 | DP73 | OLYMPUS |
| 低速离心机 | TD5 | 卢湘仪 |
| 真空吸液泵 | G6-802B | 其林贝尔 |
| A2 型二级生物安全柜 | 1800A2 | 上海知楚 |
| 流式细胞仪 | NoVoCyte 2060R | Agilent Technologies |

## 2.2 主要试剂

**表2** 实验所用主要试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **货号** | **生产商** |
| DMEM培养基 | CM10013 | 中科迈晨 |
| 0.25％Trypsin Solution | SH30042.01 | HyClone |
| Penicillin-Streptomycin Solution | SV30010 | HyClone |
| 二甲基亚砜（DMSO） | D8371 | Solarbio |
| 胎牛血清（FBS） | 10091148 | Gibco |
| 线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1) | M8650 | Solarbio |

# 2.3 实验细胞系

# BV2 (小鼠小胶质细胞):生长培养基:DMEM＋10% FBS＋1% P/S

# 3 实验方法

# 3.1细胞复苏（原代细胞和干细胞不适用）

3.1.1从液氮中取出细胞冻存管 (注意：佩戴防爆管面具) ，快速将其置入 37℃水浴中解冻，直至冻存管中无结晶，然后用 75%的酒精擦拭冻存管外壁；

3.1.2将冻存管中的细胞移至含5mL完全培养基的15mL离心管中，1000rpm离心5min；

3.1.3弃上清，沉淀用5mL完全培养基重悬，接种T25培养瓶，于 37℃，5%CO2 细胞培养箱中培养；

3.1.4第二天，换用新鲜完全培养基继续培养。

## 3.2细胞传代（原代细胞和干细胞不适用）

3.2.1细胞生长至覆盖培养瓶的 80%面积时，弃T25培养瓶中的培养液，用PBS 清洗细胞一次；

3.2.2添加 0.25%胰蛋白酶消化液约1mL至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入5mL完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至15mL离心管中，1000rpm离心5min；

3.2.3弃上清，沉淀细胞用1-2mL完全培养基重悬，然后按1:2比例进行分瓶传代 (两个 T25)，补充新的完全培养基至5-8mL/瓶，最后放入37℃，5%CO2 细胞培养箱中培养。

## 3.3 细胞冻存

3.3.1细胞生长至覆盖培养瓶的80%面积时，弃T25培养瓶中的培养液，用PBS清洗细胞一次；

3.3.2添加0.25%胰蛋白酶消化液约1mL至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入5mL完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至15mL离心管中，1000rpm离心5min；

3.3.3弃上清，沉淀细胞加入1mL/支的无血清冻存液，混匀后加入冻存管中。 (如：冻一支，加入1mL无血清冻存液)

3.3.4将冻存细胞直接放入-80℃冰箱即可；如后期要将细胞转入液氮罐中，需在-80℃冰箱存放 24 h以上。

## 3.4 细胞线粒体膜电位检测

3.4.1 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，其他培养器皿的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（200×），按照每 50μL JC-1（200 ×）加入 8mL 超纯水的比例稀释 JC-1 。剧烈震荡充分溶解并混匀 JC-1 。然后再加入 2mL JC-1 染色缓冲液（5 ×），混匀后即为 JC-1 染色工作液。

3.4.2 染色

对于悬浮细胞：

（1）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。

（2）加入 0.5mL JC-1 染色工作液，颠倒数次混匀。细胞培养箱中 37 ℃孵育 20 分钟。

（3）在孵育期间，按照每 1mL JC-1 染色缓冲液（5×）加入 4mL 蒸馏水的比例，配制适量的 JC-1 染色缓冲液（1×），并放置于冰浴。

（4）37℃孵育结束后，600g 4 ℃离心 3～4 分钟，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。

（5）用 JC-1 染色缓冲液（1×）洗涤 2 次：加入 1mL JC-1 染色缓冲液（1×）重悬细胞，600g 4 ℃离心 3～4 分钟，沉淀细胞，弃上清。再加入 1mL JC-1 染色缓冲液（1×）重悬细胞，600g 4 ℃离心 3～4 分钟，沉淀细胞，弃上清。

（6）再用适量 JC-1 染色缓冲液（1×）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。

（1）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。

（2）加入 1mL JC-1 染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中 37℃孵育 20 分钟。

（3）在孵育期间，按照每 1mL JC-1 染色缓冲液（5×）加入 4mL 蒸馏水的比例，配制适量的 JC-1 染色

缓冲液（1×），并放置于冰浴。

（4）37℃孵育结束后，吸除上清，用 JC-1 染色缓冲液（1×）洗涤 2 次。

（5）加入 2mL 细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。

（6）荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

## 3.5 实验结果解读

JC-1流式结果分析：FITC和PE之间平均荧光强度的比值，平均荧光强度是Mean值。

FITC通道采集的是JC-1 monomer（胞浆中）的绿色荧光，PE通道采集的是J-aggregates（富集于线粒体）的红色荧光，线粒体损伤时应该是J-aggregates减少而JC-1 monomer增多，应红色荧光减弱而绿色荧光增强，用FITC的平均荧光强度值/PE的平均荧光强度值评价线粒体损伤情况，故上述值越高，损伤越严重。

示意图如下：

空白组 处理组

