流式细胞术检测早期细胞凋亡之 JC-1 法

Flow Assay of Early Apoptosis by JC-1

王雪冬, 丁宇波, 葛灵, 边玮*

细胞分析技术平台, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海

*通讯作者邮箱: weibian@sibcb.ac.cn

引用格式: 王雪冬, 丁宇波, 葛灵, 边玮. (2019). 流式细胞术检测早期细胞凋亡之 JC-1 法. *Bio-101* e1010335. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010335.

How to cite: Wang, X. D., Ding, Y. B., Ge, L. and Bian, W. (2019). Flow Assay of Early Apoptosis by JC-1. *Bio-101* e1010335. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010335. (in Chinese)

摘要: 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$) 是指由线粒体内膜两侧质子分布不均一而形成的电化学梯度。线粒体膜电位的下降被认为是细胞早期凋亡的一个标志性事件。JC-1 作为亲脂阳离子荧光染料, 被广泛用于线粒体膜电位的检测: 当线粒体膜电位较高时, JC-1 可以在线粒体的基质中聚集, 形成聚合物, 从而产生红色荧光; 当线粒体膜电位较低时, JC-1 不能聚集在线粒体的基质中, 此时 JC-1 以单体形式存在, 产生绿色荧光。因此, JC-1 荧光颜色的转变可用来指示线粒体膜电位的变化情况。在本实验中, 我们用 JC-1 荧光染料分别标记经 H_2O_2 诱导和未诱导的 HeLa 细胞, 通过流式细胞仪检测 JC-1 荧光颜色的转变及变化比例, 从而判断线粒体跨膜电位的变化情况, 进而评估 HeLa 细胞的早期凋亡 (Wlodkovic 等, 2011; Sivandzade 等, 2019)。

关键词: 早期细胞凋亡, 线粒体膜电位, JC-1, 流式细胞术

材料与试剂

1. 5 ml 流式管 (Falcon, catalog number: 352008)
2. 15 ml 离心管 (BD Falcon, catalog number: 352097)
3. 70 μm 细胞过滤筛 (Falcon, catalog number: 352350)
4. HeLa 细胞 (中国科学院细胞库, SCSP-504)
5. 胰酶 (Gibco™, catalog number: 27250018)
6. DMSO (Sigma-Aldrich, catalog number: D2650)
7. JC-1 染色试剂盒 (BD™, catalog number: 551302)

8. NaCl
9. Na₂HPO₄
10. KCl
11. KH₂PO₄
12. H₂O₂
13. 1× PBS 缓冲液 (见溶液配方)
14. 20 mM H₂O₂ (见溶液配方)
15. 染色缓冲液 (见溶液配方)
16. JC-1 染色液 (见溶液配方)

仪器设备

1. CO₂ 培养箱 (Heraeus, model: HERAcell 150)
2. 水平离心机 (BeckmanCoulter, model: Allegra X-12R)
3. 旋涡混匀器 (Scientific Industries, model: Vortex-Genie 2)
4. 流式细胞分析仪 (BD LSRFortessa, 配有 355 nm/405 nm/488 nm/561 nm/638 nm 五根激光器)
5. 倒置显微镜 (Olympus, model: IX73)

实验步骤

1. 过氧化氢诱导细胞凋亡

处于对数生长期的 HeLa 细胞，加入终浓度为 0.8 mM H₂O₂ 后，放入 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 继续培养，诱导细胞凋亡。3 小时后，镜下观察发现，与没有加 H₂O₂ 的对照组细胞相比，约有 30% 细胞变圆，确定有细胞出现凋亡。

2. 收集细胞

先轻轻吹打贴壁不牢的细胞使其脱落，将培养液上清收集到 15 ml 离心管中；贴壁细胞用 0.05% 胰酶消化，得到的细胞悬液并入相应的装有上清的离心管中；细胞计数确定细胞量。常温，300 × g 离心 5 分钟，弃上清，加入 100 μl PBS 重悬细胞，取约 1 × 10⁶ 细胞作为一个反应体系进行后续实验。

3. JC-1 染色

每管加入 500 μl 新鲜配制并 37 °C 预热的 JC-1 染色液，重悬细胞，放入 5%

CO₂ 培养箱中 37°C 避光孵育 15 分钟。

4. 清洗

每管加入 2 ml 1×染色缓冲液，混匀。常温，300 × *g* 离心 5 分钟，弃上清。旋涡混匀器中速，将细胞轻轻重悬，再加入 1 ml 1×染色缓冲液，混匀。常温，300 × *g* 离心 5 分钟，弃上清。用 500 μl 1×染色缓冲液重悬细胞，样品经过滤后转移至流式管，尽快上机检测。

5. 上机，采集流式数据分析样本

在 BD LSRFortessa 流式细胞仪上，使用 488 nm 激光激发，530/30 滤光片收集发绿色荧光的 JC-1 单体信号；用 561 nm 激光激发，586/15 滤光片收集发红色荧光的 JC-1 聚合物信号。

结果与分析

通过前向散色光信号 (FSC) 和侧向散色光信号 (SSC)，排除细胞碎片，圈出主群细胞 (图 1A、1C)。再通过 JC-1 的荧光信号，判定对照组和 H₂O₂ 诱导组细胞的凋亡情况 (图 1B、1D)。对照组 HeLa 细胞线粒体膜电位处于较高水平，JC-1 聚集在线粒体的基质中形成聚合物发出红色荧光，如图 1B 所示。图 1D 中，H₂O₂ 诱导凋亡组有部分红色荧光信号转化为绿色荧光信号，说明线粒体膜电位处于较低水平，提示这群细胞处于凋亡早期。我们正是通过 JC-1 从红色荧光到绿色荧光转变的现象，来发现细胞膜电位的变化，进而作为细胞凋亡早期的一个检测指标。需要注意的是，线粒体膜电位变化的检测属于电化学方法，pH 值的改变会影响细胞膜电位变化，所以在应用时需保持染液 pH 值前后一致。

图 1. JC-1 染色分析细胞早期凋亡. A、B 为未用 H_2O_2 诱导的 HeLa 细胞，C、D 为 H_2O_2 诱导的 HeLa 细胞。

注意事项

1. 实验用储液应避免反复冻融，可小管分装避光保存；工作液现用现配。
2. 制备 JC-1 染色液时需旋涡混匀器充分混匀，如有少量沉淀出现，可通过离心去除。
3. 对于贴壁细胞可以先将细胞制成单细胞悬液后再染色制样，染色前需将染色缓冲液 $37^{\circ}C$ 预热，JC-1 染色液避光 $37^{\circ}C$ 温浴；染色全程需在 $37^{\circ}C$ 、避光进行；脱色清洗和离心时建议常温，不要低温。
4. 待样本制备完成后，尽量在 30 分钟内完成上机检测，在上机前样本需冰浴避光保存。为确保分析精度，上机检测时以低速进样，每秒事件数不大于 400 为宜。
5. 若样品中有肉眼可见的团块或者聚集体，可用 200 目尼龙网过滤后再上机检测。
6. JC-1 单体的最大激发波长为 515 nm，最大发射波长为 529 nm；JC-1 聚合物的最大激发波长为 585 nm，最大发射波长为 590 nm。实验中所用的 BD LSRFortessa 流式细胞分析仪，配有 488 nm 和 561 nm 激光器。根据仪器的配置 JC-1 单体由 488 激光器激发，采集 530/30 波段的绿色荧光信号；JC-1 聚合物由 561 激光器激发，采集 586/15 波段的红色荧光信号。如仪器只配有 488 激光，则采集由其对应的 FITC 和 PE 的检测通道收集信号即可。

溶液配方

1. 1× PBS 缓冲液

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

溶于 1 L 的 ddH₂O 中，调 pH 值为 7.2~7.4

过滤灭菌

4 °C 保存

2. 20 mM H₂O₂ 溶液

取 30% H₂O₂ 2 μl 稀释于 880 μl PBS 溶液中

3. 染色缓冲液

用于配制染色液和染色后的细胞清洗。试剂盒中配有 10× 储液。使用前，先将 10× 储液置 37 °C 水浴中温浴，确保溶液澄清各组分充分溶解，用无菌去离子水稀释成 1× 染色缓冲液，实验前新鲜配制，并置于 37 °C 预热备用

4. JC-1 染色液

将一管粉末溶于 125 μl DMSO 配成 200 μM 储液，小管分装后避光冻存于-

20 °C。实验前以 1:100 稀释于 37 °C 预热的 1× 染色缓冲液，用旋涡混匀器充分混匀。按照每份样品 (1 × 10⁶ 细胞/毫升) 用 500 μl 染色，估算实验中所需的 JC-1 染色液用量，现用现配，用前先置于 37 °C 避光温浴

致谢

感谢中科院生物化学与细胞生物研究所细胞分析技术平台的全体成员的建议和帮助。

参考文献

1. Sivandzade, F., Bhalerao, A. and Cucullo, L. (2019) [Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe.](#) *Bio-Protocol* 9(1): 5-9.

2. Wlodkowic, D., Telford, W., Skommer, J. and Darzynkiewicz, Z. (2011). [Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death.](#) *Methods Cell Biol* 103: 55-98.