

Mitotracker 染色

1.准备



- 1.1 每个共聚焦皿大约添加1-2 ml含血清培养液，此时细胞密度约为 5×10^4 /mL
- 1.2 用37°C预热的无血清培养基稀释Mitotracker至100 nM

2.洗涤



- 2.1 37°C预热的无血清培养基洗涤2次

3.染色



- 3.1 在洗涤后的共聚焦皿中加入1 mL Mitotracker工作液，37°C细胞培养箱中孵育30 min

4.洗涤



- 4.1 37°C预热的无血清培养基洗涤3 × 5 min

5.检测

- 5.1 激光共聚焦显微镜或者荧光显微镜进行观察

ATP检测

1.裂解

- 1.1 大约 1×10^5 个细胞加入100 μL 细胞裂解液
- 1.2 冰上静置10 min, 4°C, 12000g, 5min, 收集上清



2.绘制标准曲线

- 2.1 将ATP溶液稀释成0.01, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 μM



3.孔板处理

- 3.1 将100 μL ATP检测液加至96孔板中静置5 min



4.检测

- 4.1 在检测孔中加入10-20 μL 标准品或样品



5.检测

- 5.1 用化学发光仪或者携带化学发光检测功能的酶标仪检测

线粒体膜电位检测

1.阳性对照

1.1 在=培养基中加入CCCP，使其最终浓度达到10 μM 。37°C处理20 min



2.准备

2.1 当细胞生长至70%融合度时即可实验；悬浮细胞应离心后用无血清细胞培养基重悬



3.洗涤

3.1 在洗涤后的共聚焦皿中加入1 mL Mitotracker工作液，37°C细胞培养箱中孵育30 min



4.洗涤

4.1 无血清培养基洗涤2次；悬浮细胞用无血清细胞培养基离心重悬2次



5.染色

5.1 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ JC-1工作液，37°C细胞培养箱内孵育30 min



6.洗涤

6.1 无血清培养基洗涤2次；悬浮细胞用无血清细胞培养基离心重悬2次



7.检测

7.1 使用流式细胞仪，荧光显微镜或酶标仪进行观察。

常见问题解析

1. Mitotracker荧光信号低怎么办？

- ①评估细胞状态：确保使用的实验细胞为存活状态；确保细胞密度足够；
- ②评估探针质量：避免Mitotracker储存液反复冻融，建议适量分装；Mitotracker工作液应现配现用，且注意避光；
- ③优化实验条件：适当增加染料的浓度或者孵育时间；若背景信号低，可减少洗涤次数；
- ④染色后及时观察实验结果；
- ⑤选择恰当的荧光通道，必要时查询荧光光谱网站。

2. Mitotracker荧光信号淬灭怎么办？

- ①染色及成像过程注意避光；
- ②保证成像质量的前提下，降低激光强度，避免长时间观察；
- ③染色后及时成像观察。

3. 若实验需要结合免疫细胞化学或原位杂交等技术，应如何使用线粒体染料？

- ①根据实验需求选择适用于固定细胞的Mitotracker染料；
- ②先使用活细胞进行Mitotracker染色，后进行免疫细胞化学或原位杂交等实验；
- ③适当缩短醛类固定剂的固定时间，减少通透剂（TritonX-100）的浓度。