

## P-18 如何测定细胞内pH

### 方法

#### 1. 人中性粒细胞的细胞内pH测定

##### (1) 试剂

中性粒细胞 (从人血液中提取)

HEPES缓冲液

(153 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 5 mmol/l 葡萄糖, 20 mmol/l HEPES, pH 7.4)

BCECF-AM special packaging

标定用缓冲液

(130 mmol/l KCl, 10 mmol/l NaCl, 1 mmol/l MgSO<sub>4</sub>, 10 mmol/l Na-MOPS)

Nigericin

##### (2) 染色及测定方法

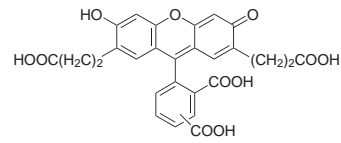
- 1) 用HEPES制备细胞悬液, 细胞浓度为 $4 \times 10^7$ 个/ml。
- 2) 加入1 mmol/l的BCECF-AM溶液, 终浓度为3  $\mu$ mol/l, 在37 °C下培养30 min。
- 3) 用HEPES缓冲液充分清洗细胞外的BCECF-AM和凝集的中性粒细胞。
- 4) 用缓冲液将BCECF染色的细胞制成 $3 \times 10^7$ 个/ml的细胞悬液。
- 5) 取适量的细胞悬液, 细胞数量为 $3 \times 10^6$ 个/ml, 用荧光光度计测定荧光 (激发波长500 nm, 发射波长530 nm)。
- 6) 在37 °C下培养10 min后, 添加刺激药物, 记录荧光强度的变化。

##### (3) 标准曲线

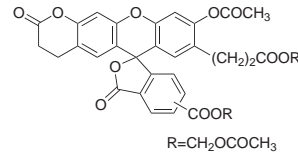
- 1) 准确配制标定用缓冲液 (例如pH值: 6.6、7.0、7.2、7.4、7.8、8.2)。
- 2) 从细胞悬液中取 $3 \times 10^6$ 个/ml细胞, 离心清洗后用1 ml 标定缓冲液混合, 制成细胞悬液。
- 3) 加入Nigericin终浓度为10  $\mu$ g/ml, 培养约10 min后, 测定荧光强度。
- 4) 以横轴为缓冲液的pH值, 纵轴为荧光强度作图。

#### 2. 注意事项

- 1) 若BCECF很难转入细胞, 可以同Fura 2一样, 用 Pluronic F<sup>®</sup>-127等表面活性剂。
- 2) 请先将Nigericin用乙醇配制成2 mg/ml的储备液。

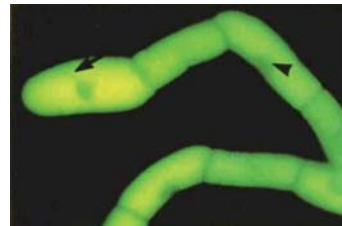


**BCECF**  
M.W.: 536.48

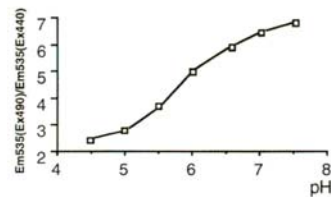


**BCECF-AM**  
M.W.: 688.59  
R=CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>

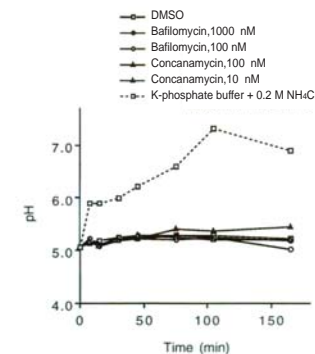
### 实验例



- 1). 细胞与BCECF-AM共培养后, 通过荧光显微镜观察到细胞内部黄绿色荧光。箭头分别标注细胞核与细胞质。



- 2). BCECF荧光强度与pH值标准曲线图



- 3). 经两种不同浓度及药物作用后, 且负载了BCECF的BY-2细胞内pH值随时间变化的曲线图

### 参考文献

1. Eilon Woolf, *et al.*, Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces, *Nature Immunology*, **2007**, 8(10), 1076-85
2. Yoshinori Fukui, *et al.*, Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration, *Nature*, **2001**, 412, 826-831