

JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒

JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit



产品货号: J6004S, J6004L

产品规格: 20T, 100T

储存条件: -20℃避光冷藏, 其中 B 组份也可 4℃保存。为避免反复冻融, A 与 C 组份建议分装。有效期见外包装。

应用范围: 细胞凋亡检测

产品组分

组分	J6004S (20T)	J6004L (100T)
A: JC-1, 100× in DMSO	100 μL	500 μL
B: 10× Assay Buffer	5 mL	25 mL
C: CCCP, 50 mM	10 μL	50 μL

产品介绍

线粒体膜电位降低是细胞早期凋亡的一个标志, 它发生在细胞膜上的磷脂酰丝氨酸外翻与 Caspase 水解酶激活之前。当线粒体膜通透性发生改变时, 膜电位会降低。这种膜电位的改变是由于 Bax 二聚体的形成和 Bid, Bak, Bad 的激活, 从而诱导线粒体膜形成孔隙造成的。当这些促凋亡蛋白被激活时, 线粒体同时也将细胞色素 C 释放到细胞质中。

JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位 $\Delta \Psi_m$ 的理想荧光探针, 它可以检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位。在线粒体膜电位较高时, JC-1 聚集在线粒体的基质中, 形成聚合物, 产生红色荧光; 在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 为单体, 可以产生绿色荧光。通过 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变可以很容易地检测到膜电位的下降, 同时也可以利用 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变作为细胞凋亡早期的一个检测指标。

JC-1 单体的最大激发波长为 510 nm, 最大发射波长为 527 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。本试剂盒操作简单快速, 可以通过流式细胞仪, 荧光显微镜或荧光酶标仪进行检测, 同时提供了 CCCP 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。

使用方法

1. 试剂准备

配制 JC-1 工作液

按如下方案配置 1 mL 1×JC-1 染色工作液: 取 10 μL 100×JC-1 染色液, 加入到 890 μL 灭菌的 diH₂O 中, 涡旋混匀, 向上述混合液中加入 100 μL 10× Assay Buffer, 涡旋混匀, 即可得到 1×JC-1 染色液。

注: ①配置体积可同比例扩大或缩小。

②不建议直接用 1×Assay Buffer 稀释 100×JC-1 染色液, 可能会出现沉淀。



配制 1× Assay Buffer

按照 10× assay buffer : diH₂O = 1 : 9 的比例配置 1× assay buffer, 如 1 mL 10× assay buffer + 9 mL diH₂O。

2. 细胞染色

开始实验之前, 请确保 JC-1 和 CCCP 溶液已恢复至室温。

- (1) 按实验所需, 在培养板中接种细胞 (悬浮细胞不要超过 10⁶ 个/mL)。
- (2) 阳性对照组: 把试剂盒中提供的 CCCP (50 mM) 推荐按照 1:1000 的比例加入到细胞培养液中 (如终浓度为 50 μM 即 1 μL 50 mM 的 CCCP 溶液加入至 1 mL 细胞培养液中), 37°C 孵育 20 min。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。

对于悬浮细胞:

- (3) 取 5×10⁵ 个细胞, 重悬于 0.5 mL 细胞培养液中, 细胞培养液中可以含血清和酚红。
- (4) 加入 0.5 mL JC-1 染色工作液, 颠倒数次混匀。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 min。
- (5) 孵育结束后, 1000 rpm 离心 5 min, 弃上清 (注意尽量不要吸除细胞)。
- (6) 加入 1 mL 预冷的 1× Assay Buffer 重悬细胞, 1000 rpm 离心 5 min, 离心去除上清, 重复一次。
- (7) 再用适量预冷的 1× Assay Buffer 重悬, 用荧光显微镜观察, 也可以用流式细胞仪分析。

对于贴壁细胞:

注意: 对于贴壁细胞, 如果希望采用流式细胞仪检测, 可以先收集细胞, 重悬后参考悬浮细胞的检测方法。以下为贴壁细胞对于荧光显微镜或荧光酶标仪的检测流程。

- (3) 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 1 mL 细胞培养液。细胞培养液中可以含有血清和酚红。
- (4) 加入 1 mL JC-1 染色工作液, 充分混匀。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 min。
- (5) 孵育结束后, 吸除上清, 加入 1 mL 预冷的 1× Assay Buffer, 吸除上清, 重复一次。
- (6) 加入 2 mL 细胞培养液, 培养液中可以含有血清和酚红, 用荧光显微镜下观察, 也可以用荧光酶标仪检测。

3. 结果分析

(1) 流式细胞仪分析

对于正常细胞, 在 PE 或 PI (FL2) 通道可以检测到线粒体内的 JC-1 红色聚集物; 对于凋亡细胞, 在 FITC (FL1) 通道可以检测到 JC-1 绿色单体物。

(2) 荧光显微镜分析

- a. 采用可以同时检测荧光素和罗丹明, 或者荧光素与 Texas Red 的双通道滤波器荧光显微镜观察细胞。
- b. 对于正常细胞, 拥有完整的线粒体膜电位, 线粒体在 590 nm 处发出红色荧光; 对于凋亡或坏死的细胞, 染料以单体形式存在, 在 530 nm 处发出绿色荧光。

(3) 荧光酶标仪分析

- a. 红色荧光: Ex/Em=550/600 nm; 绿色荧光 Ex/Em=485/535 nm。
- b. 计算红绿荧光比值。
- c. 与正常细胞相比, 在凋亡或坏死细胞中, 红绿荧光比值会降低。



注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
2. JC-1(100× in DMSO)在较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可以 20-25℃水浴温育片刻至全部融解后使用。
3. 配制 JC-1 染色工作液时，必须先把试剂盒提供的 JC-1(100× in DMSO)用灭菌 diH₂O 充分溶解混匀后，才可以加入 10× Assay Buffer。不可先配制 1× Assay Buffer 再加入 JC-1(100× in DMSO)，这样 JC-1 会很难充分溶解，会严重影响后续的检测。
4. JC-1 染色完成后用 1× Assay Buffer 洗涤时，使 1× Assay Buffer 保持 4℃左右，此时的洗涤效果较好。
5. JC-1 染色并洗涤完成后尽量在 30 分钟内完成后续检测。在检测前需冰浴保存。
6. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
7. 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

