

线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)

货号规格

货号	规格
100-117	100次

产品简介

线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1) (Mitochondrial membrane potential assay kit with JC-1)是一种以JC-1为荧光探针，快速灵敏地检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位变化的试剂盒，可以用于早期的细胞凋亡检测。JC-1是一种广泛用于检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential) $\Delta\Psi_m$ 的理想荧光探针。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(matrix)中，形成聚合物(J-aggregates)，可以产生红色荧光；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(monomer)，可以产生绿色荧光。这样就可以通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化。常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件。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细胞膜电位的下降，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。

本试剂盒提供了CCCP作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。对于六孔板中的样品，本试剂盒提供的CCCP共可以检测30个样品；对于12孔中的样品，本试剂盒共可以检测60个样品。

产品组分

组分名称	包装	编号
JC-1(200x)	200 μ L*5管	100-117A
CCCP(50mM)	30 μ L	100-117B
超纯水	90 mL	100-117C
JC-1染色缓冲液(5x)	80 mL	100-117D

保存条件

冰袋运输。-20℃避光保存，JC-1(200x)尽量避免反复冻融，有效期一年。

注意事项

1. JC-1 (200x) 和CCCP需放置室温平衡至室温 (20~25℃) 后使用。
2. **必须先把JC-1 (200x) 用试剂盒提供的超纯水充分溶解混匀后，才可以加入JC-1染色缓冲液 (5x)。**不可先配制JC-1染色缓冲液 (1x) 再加入JC-1 (200x)，这样JC-1会很难充分溶解，会严重影响后续的检测。
3. 装载完JC-1后用JC-1染色缓冲液 (1x) 洗涤时，使JC-1染色缓冲液 (1x) 保持4℃左右，此时的洗涤效果较好。
4. JC-1探针装载完并洗涤后尽量在30分钟内完成后续检测。在检测前需冰浴保存。
5. 请勿把JC-1染色缓冲液 (5x) 全部配制成JC-1染色缓冲液 (1x)，本试剂盒使用过程中需直接使用JC-1染色缓冲液 (5x)。
6. 如果发现JC-1染色缓冲液 (5x) 中有沉淀，必须全部溶解后才能使用，为促进溶解可以在37℃加热。
7. CCCP为线粒体电子传递链抑制剂，对人体有害，使用时请做好防护。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

检测方法

1. 阳性对照的设置：

把试剂盒中提供的CCCP（50mM）推荐按照1：1000的比例加入到细胞中，稀释至50 μ M，处理细胞10-20分钟。随后按照下述方法装载JC-1，进行线粒体膜电位的检测。对于大多数细胞，通常50 μ M CCCP处理10-20分钟后线粒体的膜电位会完全丧失，JC-1染色后观察应呈绿色荧光；而正常的细胞经JC-1染色后应显示红色荧光。对于特定的细胞，CCCP的作用浓度和作用时间可能有所不同，需自行摸索最优条件。

2. JC-1染色工作液的配制：

6孔板每孔所需JC-1染色工作液的量为1 mL，12孔板每孔所需JC-1染色工作液的量为0.5 mL，其它培养器皿的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0.5 mL JC-1染色工作液。JC-1染色工作液配制参考下表：

总体积	1 mL	10 mL
JC-1(200 $\times$)	10 μ L	100 μ L
超纯水	790 μ L	7.9 mL
JC-1染色缓冲液（5 $\times$ ）	200 μ L	2 mL

▲JC-1（200 $\times$ ），先用超纯水按比例稀释并剧烈震荡充分溶解，然后再加入染色缓冲液（5 $\times$ ），混匀后即为JC-1染色工作液。

3. 对于悬浮细胞：

- 1) 取10-50万个细胞，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。
- 2) 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 $^{\circ}$ C孵育15-30分钟。
- 3) 在孵育期间，按照每1 mL JC-1染色缓冲液（5 $\times$ ）加入4 mL蒸馏水的比例，配制适量的JC-1染色缓冲液（1 $\times$ ），并放置于冰上。
- 4) 37 $^{\circ}$ C孵育结束后，1500 rpm 4 $^{\circ}$ C离心3~4分钟，弃上清。
- 5) 用JC-1染色缓冲液（1 $\times$ ）洗涤细胞1-2次。
- 6) 再用适量JC-1染色缓冲液（1 $\times$ ）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1 mL细胞培养液。细胞培养液中可以含有血清和酚红。
- 2) 加入1 mL JC-1染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育15-30分钟。
- 3) 在孵育期间，按照每1 mL JC-1染色缓冲液(5 $\times$)加入4 mL蒸馏水的比例，配制适量的JC-1染色缓冲液(1 $\times$)，并放置于冰上。
- 4) 37 $^{\circ}$ C孵育结束后，吸除上清，用JC-1染色缓冲液(1 $\times$)洗涤2次。
- 5) 加入2 mL JC-1染色缓冲液(1 $\times$)，荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

5. 对于纯化的线粒体：

- 1) 把配制好的JC-1染色工作液再用JC-1染色缓冲液(1 $\times$)稀释5倍。
- 2) 0.9 mL 5倍稀释的JC-1染色工作液中加入0.1 mL总蛋白量为10-100 μ g纯化的线粒体。

- 3) 用荧光分光光度计或荧光酶标仪检测：混匀后直接用荧光分光光度计进行时间扫描(time scan)，激发波长为485 nm，发射波长为590 nm。如果使用荧光酶标仪，激发波长不能设置为485 nm时，可以在475-520 nm范围内设置激发波长。另外，也可以参考下面步骤6中的波长设置进行荧光检测。
- 4) 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察：方法同下面的步骤6。

6. 荧光观测和结果分析：

- 1) 检测JC-1单体时可以把激发光设置为490 nm，发射光设置为530 nm；检测JC-1聚合物时，可以把激发光设置为525 nm，发射光设置为590 nm。▲此处测定荧光时不必把激发光和发射光设置在最大激发波长和最大发射波长。如使用荧光显微镜观察，检测JC-1单体时可以参考观察其它绿色荧光时的设置，如观察GFP或FITC时的设置；检测JC-1聚合物时可以参考观察其它红色荧光，如碘化丙啶或Cy3时的设置。出现绿色荧光说明线粒体膜电位下降，并且该细胞很可能处于细胞凋亡早期。出现红色荧光说明线粒体膜电位比较正常，细胞的状态也比较正常。