

## 线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)

货号: P-CA-005

规格: 20Assays / 50Assays / 100Assays

产品名称	20Assays	50Assays	100Assays	Storage
JC-1 (500×)	20 μL	50 μL	100 μL	-5~-20°C, 避光
JC-1 Assay Buffer (10×)	4 mL	10 mL	10 mL×2	2~8°C
10 mM CCCP	40 μL	40 μL	40 μL	-5~-20°C, 避光
说明书			一份	

### 保存条件

JC-1 Assay Buffer (10×)请 2~8°C 保存, 其余试剂保存于-5~-20°C。保质期一年。

JC-1 (500×)和 10 mM CCCP 需避光保存, 避免反复冻融。

### 产品简介

线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)以 JC-1 为荧光探针, 通过快速检测线粒体膜电位变化从而检测细胞早期凋亡的试剂盒。本试剂盒提供羧基氰化物间氯苯胺 (CCCP) 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照试剂。

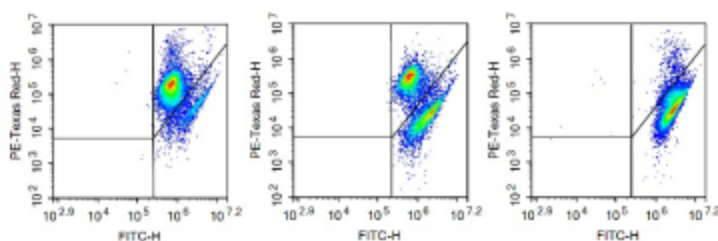
### 检测原理

线粒体膜电位下降是细胞凋亡早期的标志性事件, 发生在细胞核凋亡特征 (染色质浓缩、DNA 断裂) 出现之前, 一旦线粒体膜电位崩溃, 细胞凋亡便不可逆转。

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, 可以检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位。JC-1 有单体和多聚体两种存在形式, 两者发射光谱不同。在正常细胞内, 线粒体膜电位较高, JC-1 以多聚体形式存在于线粒体的基质中, 产生红色荧光; 凋亡早期, 线粒体膜电位降低, JC-1 以单体形式存在于线粒体基质中, 产生绿色荧光。

通过 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变可反映细胞膜电位的下降, 可将 JC-1 荧光颜色的转变作为细胞凋亡早期的检测指标。常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。

JC-1 单体的最大激发波长为 514 nm, 最大发射波长为 529 nm; JC-1 多聚体的最大激发波长为 585 nm, 最大发射波长为 590 nm。实际观察时, 常规设置红色荧光和绿色荧光即可。



本试剂盒检测喜树碱诱导的 Jurkat 细胞凋亡效果如下图所示: 正常细胞 (左) 存在少量凋亡, 表现为出现少量线粒体膜电位崩塌细胞; 诱导凋亡细胞 (中, 2.5 μM 喜树碱处理 Jurkat 细胞 24 h) 出现大量线粒体膜电位崩塌细胞; CCCP 处理细胞 (右, 阳性对照) 几乎所有细胞线粒体膜电位崩塌。

网站: [www.procell.com.cn](http://www.procell.com.cn)

电话: 400-999-2100; 027-87287608

邮箱: [sales@procell.com.cn](mailto:sales@procell.com.cn)

地址: 湖北省武汉市高新大道858号生物医药产业园三期C4栋



## 自备试剂及仪器

超纯水、荧光显微镜/激光共聚焦显微镜、流式细胞仪。

## 试剂配制

### 1. JC-1 工作液配制

按照每 20  $\mu\text{L}$  JC-1 (500 $\times$ ) 加入 9 mL 超纯水 (自备) 的比例稀释 JC-1, 涡旋混匀, 再加入 1 mL JC-1 Assay Buffer (10 $\times$ ), 混匀后即为 JC-1 工作液。

注:

- JC-1 工作液需现配现用。
- 6孔板每孔所需 JC-1 工作液的量为 1 mL, 其他培养器皿的 JC-1 工作液的用量以此类推。对于细胞悬液, 每  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个细胞所需 JC-1 工作液的量为 0.5 mL。
- 因 JC-1 在水中的溶解度较小, 为促进溶解可  $37^\circ\text{C}$  加热。

### 2. 1 $\times$ JC-1 Assay Buffer 的配制

用超纯水将 JC-1 Assay Buffer (10 $\times$ ) 稀释 10 倍, 配置好的 1 $\times$  JC-1 Assay Buffer 保存于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 。

## 实验操作指南

### ➤ 预备步骤

设置阳性对照 (仅阳性对照样本需要此步骤): 用细胞培养液将 10 mM CCCP 稀释 1000 倍, 使 CCCP 终浓度为 10  $\mu\text{M}$ , 按照用 10  $\mu\text{M}$  CCCP 孵育细胞 20 分钟。

注: 对大多数细胞, 用 10  $\mu\text{M}$  的 CCCP 处理 20 分钟, 线粒体膜电位会完全丧失, JC-1 染色后呈绿色荧光, 而正常的细胞经 JC-1 染色后呈红色荧光。对于特定的细胞, CCCP 的作用浓度和时间可能有所不同, 请参考相关文献。

### ➤ 悬浮细胞实验步骤

- 收集细胞悬液并进行细胞计数, 取  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个细胞,  $300 \times g$  离心 5 min, 弃上清。
- 用 500  $\mu\text{L}$  JC-1 工作液重悬细胞,  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min。

注: 孵育温度与细胞类型有关, 一般哺乳动物细胞为  $37^\circ\text{C}$ , 其他种属根据细胞培养条件选择合适的温度。

- 孵育结束后,  $300 \times g$  离心 5 min, 弃上清, 用预冷的 1 $\times$  JC-1 Assay Buffer 洗细胞 1 次 ( $300 \times g$ , 5 min), 弃上清。
- 用适量预冷的 1 $\times$  JC-1 Assay Buffer 重悬细胞, 优先用流式细胞仪进行分析, 也可以用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜进行观察。

注:

- 为防止荧光淬灭, 请尽快 (30 min 内) 进行检测/观察, 检测前请  $4^\circ\text{C}$  避光保存。
- 荧光显微镜观察结果时, 为避免荧光淬灭过快, 建议先将白光光源和荧光功率尽量调低, 然后调节适宜的曝光时间进行观察/拍照。

### ➤ 贴壁细胞实验步骤

对于贴壁细胞用流式细胞仪检测的情况, 可以先收集细胞, 然后参考上述细胞悬液实验步骤进行检测。须注意的是, 良好的细胞状态是实验的关键。贴壁生长的细胞用于凋亡检测时, 可能会



因为胰酶消化、吹打等机械操作造成细胞坏死或凋亡，从而影响实验结果。

1. 吸弃培养上清，用1×JC-1 Assay Buffer清洗细胞一次。
2. 加入1mL JC-1工作液，37°C孵育20 min。

注：

- a) 6孔板每孔所需JC-1工作液的量为1 mL，其他培养器皿的JC-1工作液的用量以此类推。
  - b) 孵育温度与细胞类型有关，一般哺乳动物细胞为37°C，其他种属根据细胞培养条件选择合适的温度。
3. 孵育结束后，用1×JC-1 Assay Buffer清洗细胞一次，然后加入2 mL 细胞培养液或1×JC-1 Assay Buffer。
  4. 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察结果。

注：

- a) 为防止荧光淬灭，请尽快（30 min内）进行检测/观察，检测前请4°C避光保存。
- b) 荧光显微镜观察结果时，为避免荧光淬灭过快，建议先将白光光源和荧光功率尽量调低，然后调节适宜的曝光时间进行观察/拍照。

### 注意事项

1. 本产品仅用于科研，不得用于临床诊断。
2. 为了您的安全和健康，请遵守实验室试剂操作规范操作。CCCP为线粒体电子传递链抑制剂，对人体有害，操作时请穿实验服并戴一次性手套，避免直接接触人体或吸入体内。
3. 本试剂盒有效期为1年，为获得最佳使用效果，建议在3~6个月内使用。
4. JC-1在较低温度情况下会有凝固或沉淀，可在20~25°C水浴至全部溶解后使用。
5. 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光。

