

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01084

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 线粒体膜电位检测试剂盒（绿色，红色）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 线粒体膜电位检测试剂盒（绿色，红色）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，为单体，可以产生绿色荧光。通过 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒（绿色，红色）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 线粒体膜电位检测试剂盒（绿色，红色）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。

应用范围

线粒体荧光染料

储运条件

-20 °C 避光冷藏，其中 B 组份也可 4 °C 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；冰袋运输。

产品特点

信号准确：提供阳性药物做对照；

方便快捷：染料是液体稀释，无需再溶解。

产品参数

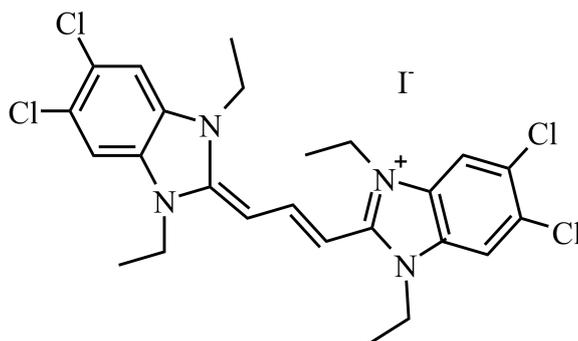
单体 Ex/Em: 510/527 nm

聚合物 Ex/Em: 585/590 nm

分子式: C₂₅H₂₇Cl₄N₄

分子量: 652.2

分子结构图:



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 °C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
- 3.在配置溶液前，若发现组分 B 有析出，一定要先水浴加热处理，确保完全溶解再使用。
- 4.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 ddH₂O 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。若出现沉淀，可 37 °C 加热处理。
- 5.工作液配置完成后，一定要及时孵育细胞，避免工作液产生沉淀。
- 6.染色完成后用 1 × Assay Buffer 洗涤时，使 1 × Assay Buffer 保持 4 °C 左右，此时的洗涤效果较好。
- 7.JC-1 染色并洗涤完成后尽量在 30 min 内完成后续检测。在检测前需冰浴保存。
- 8.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。
- 9.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。
- 10.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

- 1.耗材：细胞培养板
2. 仪器：荧光显微镜 或 荧光酶标仪

操作步骤

1.试剂准备

- (1) 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 ddH₂O 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。**

- (2) 配制 1 × Assay Buffer

按照 10 × assay buffer：ddH₂O = 1：9 的比例配置 1 × assay buffer，如 1 mL 10 × assay buffer + 9 mL ddH₂O。

2.染色

开始实验之前，请确保 JC-1 和 CCCP 溶液已恢复至室温。

- (1) 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。

3.对于悬浮细胞

- (1) 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。
- (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 °C 孵育 20 min。
- (3) 孵育结束后，1000 rpm 离心 5 min，弃上清（注意尽量不要吸除细胞）。
- (4) 加入 1 mL 预冷的 1 × Assay Buffer 重悬细胞，1000 rpm 离心 5 min，去除上清，重复一次。
- (5) 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。

4.对于贴壁细胞

注：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。

- (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 °C 孵育 20 min。
- (3) 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。
- (4) 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。

5. 纯化后的线粒体

- (1) 0.9 mL JC-1 染色工作液中加入 0.1 mL 总蛋白量为 10~100 µg 纯化的线粒体。
- (2) 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),
- (3) 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。
- (4) 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察。

6. 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

- 1) 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。
- 2) 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

- 1) 红色荧光: Ex/Em: 550/600 nm; 绿色荧光: Ex/Em: 485/535 nm。
- 2) 计算红绿荧光比值。

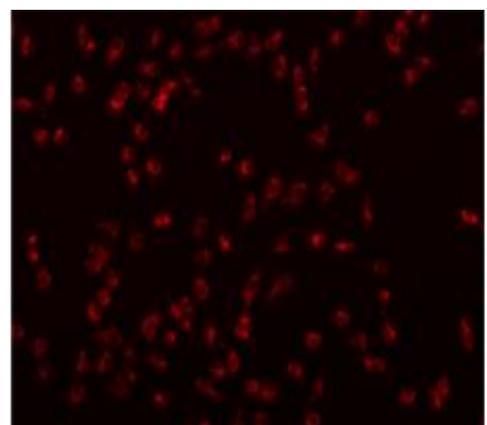
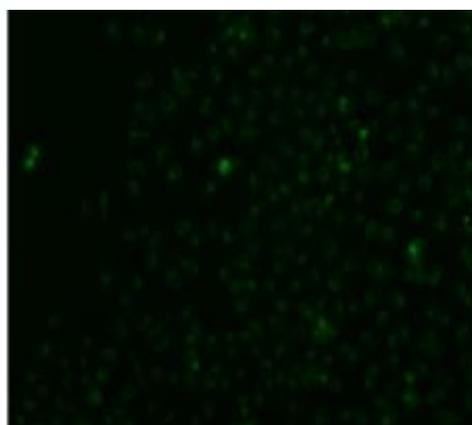
与正常细胞相比, 在凋亡或坏死细胞中, 红绿荧光比值会降低。

表 1 JC-1 细胞染色条件

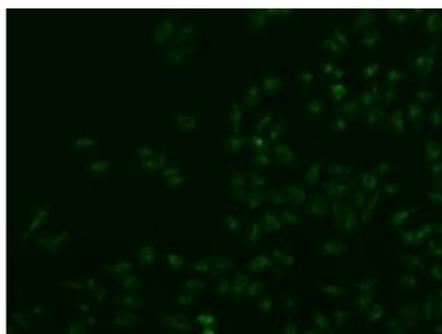
Method	Cell Type	Adherent /Dissociated	Incubation Conditions		
			Dye Concentration	Temperature	Time
Microscope	Neurons (rat)	Adherent	2.0 µg/mL	37 °C	20~30 min
	Neurons (rat)	Adherent	1.0 µg/mL	37 °C	20 min
	O-2A Oligodendrocytes (rat)	Adherent	10 µg/mL	37 °C	10 min
	PC12	Adherent	10 µg/mL	37 °C	10 min
	Cardiac Myocytes (rat)	Dissociated	10 µg/mL	37 °C	10 min
Flow Cytometer	Human Fibroblasts	Dissociated	0.3 µg/mL	37 °C	1 hour
	Colo-205	Dissociated	10 µg/mL	37 °C	10 min
	U937	Dissociated	10 µg/mL	22 °C	10 min

染色效果图 (图 1)

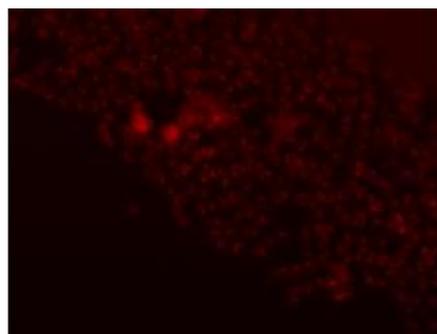
control组



CCCP组



单体



聚合物

图 1 JC-1 染色效果图