

产品说明书

产品名称：JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒

产品货号：BN16004

产品规格：20T, 100T

产品内容：

组分	20T	100T
A: JC-1, 100× in DMSO	100 μL	500 μL
B: 10× Assay Buffer	2 mL	10 mL
C: CCCP, 50 mM	10 μL	50 μL

储存条件

组分 A、B 需 4℃ 避光冷藏，并尽量避免反复冻融，组分 C - 20℃ 保存。本产品推荐条件下可以储存 12 个月。

光谱特性

Ex/Em: 510/527 nm (单体物, 绿色);

585/590 nm (聚合物, 红色)

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。这款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检测。

使用方法

一、试剂准备

配制 JC-1 工作液

按如下方案配置 1mL 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

用 diH₂O 按 10: 1 稀释检测缓冲液，如 1 mL 10× assay buffer + 9 mL diH₂O)

二、流式细胞染色方案

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：根据培养基的量加入相应体积 50 mM 的 CCCP 溶液(如终浓度为 50 μM 即 1 mL 培养基加入 1 μL 50 mM 的 CCCP 溶液)，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. 对于贴壁细胞，染色前进行消化处理，将其制成细胞悬液，0.5 mL 装于离心管中。
 4. 室温下 400 x g，离心 5 min。
 5. 除去上清。
 6. 用 0.5 mL 的 JC-1 工作液重悬细胞。
 7. 置于 37°C 细胞培养箱，孵育 15 min。
 8. 室温下 400 x g，离心 5 min，去除上清。
 9. 用 2 mL 的 PBS 缓冲液、培养基或 1× Assay Buffer 重悬细胞，离心去除上清，重复一次。
 10. 用 0.5 mL 的 PBS、培养基或 1× Assay Buffer 重悬细胞，用流式细胞仪检测分析。

注：

流式细胞仪定量分析

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。

三、荧光显微镜染色方案

悬浮细胞染色

1. 参照流式细胞仪染色方案，对细胞进行染色。
2. 用 0.3 mL 的 PBS 或培养基重悬细胞。

贴壁细胞染色

1. 在培养皿或培养板上接种细胞。

2. 阳性对照组：根据培养基的量加入相应体积 50 mM 的 CCCP 溶液(如终浓度为 50 μM 即 1 mL 培养基加入 1 μL 50 mM 的 CCCP 溶液)，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. 去除培养基，加入 JC-1 工作液使其覆盖细胞表面。
4. 置于 37°C 细胞培养箱，孵育 15 min。
5. 除去染液，用 PBS 缓冲液、培养基或 1× Assay Buffer 清洗一次细胞。
6. 用荧光显微镜观察分析。

荧光显微镜成像

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。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，细胞质发出绿色荧光；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。

四、测定荧光相对比率染色方案

1. 按照实验要求在 96 孔板中接种细胞。
2. 阳性对照组：根据培养基的量加入相应体积 50 mM 的 CCCP 溶液(如终浓度为 50 μM 即 1 mL 培养基加入 1 μL 50 mM 的 CCCP 溶液)，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. 根据荧光显微镜细胞染色方案对细胞进行染色处理。
4. 用荧光酶标仪检测荧光值(红色荧光: Ex/Em=550/600 nm; 绿色荧光 Ex/Em=485/535 nm)。
5. 计算红绿荧光比值。
6. 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。