

Enhanced Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit with JC-1

Cat. No: PBCA009

Size: 50T/100T

产品编号	产品名称	50T	100T	Storage
PBCA009A	JC-1 (500×)	50μL	50μL × 2	-20 °C, shading light
PBCA009B	JC-1 Assay Buffer (10×)	10mL	10mL × 2	2~8 °C
PBCA009C	10mM CCCP	40μL × 1	40μL × 1	-20 °C, shading light
	说明书		一份	

保存条件

JC-1 Assay Buffer (10×) 2~8 °C 保存，其余试剂保存于-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

增强型线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1) (Enhanced mitochondrial membrane potential assay kit with 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。本产品经优化处理，极大提高了 JC-1 进入细胞的效果，从而增强了染色效果。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。

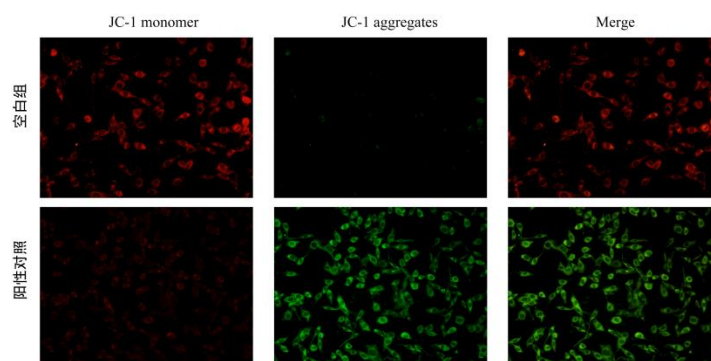
检测原理

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线粒体膜电位的下降，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。





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 μ 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:

a) JC-1 工作液需现配现用。

b) 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。

c) 因 JC-1 在水中的溶解度较小, 为促进溶解可 37 $^{\circ}$ 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 2~8 $^{\circ}$ 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 μ M, 按照用 10 μ M CCCP 孵育细胞 20min。

注: 对大多数细胞, 用 10 μ M 的 CCCP 处理 20min, 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

1. 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 5min, 弃上清。

2. 用 500 μ L JC-1 工作液重悬细胞, 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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, 300 $\times$ g 离心 5min, 弃上清, 用预冷的 1 $\times$ JC-1 Assay Buffer 洗细胞 1 次 (300 $\times$ g, 5min), 弃上清。

4. 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:

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 $^{\circ}$ 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。

c) 若荧光显微镜滤光片为长通滤光片, 可以在绿色荧光通道同时检测正常细胞和膜电位降低细胞。



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 $1\times$ 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。

c) 对于贴壁能力弱的细胞，建议先做防脱处理后再进行细胞的接种和染色，或者用基础培养基直接将 JC-1 (500 $\times$) 稀释成 $1\times$ 来配制 JC-1 工作液。

3. 孵育结束后，用 $1\times$ JC-1 Assay Buffer 清洗细胞一次，然后加入 2mL 细胞培养液或 $1\times$ 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，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。

c) 若荧光显微镜滤光片为长通滤光片，可以在绿色荧光通道同时检测正常细胞和膜电位降低细胞。

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 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 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。