线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1 法)

产品简介:

JC-1 是一种检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential)的理想荧光探针，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，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，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，这种转变也可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 514nm，最大发射波长为 529nm，JC-1 聚合物(J-aggregates)的最大激发波长为 585nm，最大发射波长为 590nm，实际观察时使用常规的观察红色荧光和绿色荧光的装置即可。

线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1 法)(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，CCCP 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCCT0045 50T	GCCT0045 100T	Storage
试剂(A): JC-1 Stain(200×)	3×100μl	5×100μl	-20℃ 避光
试剂(B): JC-1 Buffer(5×)	40ml	80ml	4℃
试剂(C): CCCP(1mM)	100μl	200μl	-20℃
试剂(D): ddH_2O	45ml	90ml	RT
使用说明书	1 份		

操作步骤(仅供参考):

1、配制 JC-1 染色工作液:

取适量 JC-1 Stain (200×)，按照每 50μl JC-1 Stain (200×)加入 8ml ddH_2O 的比例稀释 JC-1，剧烈 Vortex 充分溶解并混匀 JC-1 Stain，然后再加入 2ml JC-1 Buffer(5×)，混匀后即为 JC-1 染色工作液，6 孔板每孔所需 JC-1 染色工作液的量为 1ml，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 0.5～1.0×10^6 细胞需 0.5ml JC-1 染色工作液。

2、 设置阳性对照：

推荐 CCCP(1mM)按照 1：100 的比例加入到细胞培养液中，稀释至 10μM，处理细胞 20min，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 10μM CCCP 处理 20min 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，需自行参考相关文献资料确定。

3、对于悬浮细胞：

a. 取 1～6×10^5 细胞，重悬于 0.5ml 细胞培养液中，细胞培养液中可以含血清和酚红。

b. 加入 0.5ml JC-1 染色工作液，颠倒数次混匀，细胞培养箱中 37℃孵育 20min。

c. 在孵育期间，按照每 1ml JC-1 Buffer(5×)加入 4ml 蒸馏水的比例，配制适量的 JC-1 Buffer(1×)，并放置于冰浴。

d. 37℃孵育结束后，4℃ 600g 离心 3～4min，沉淀细胞，弃上清，注意尽量不要吸除细胞。

e. 用 JC-1 Buffer(1×)洗涤 2 次：加入 1ml JC-1 Buffer(1×)重悬细胞，4℃ 600g 离心 3～4min，沉淀细胞，弃上清，再加入 1ml JC-1 Buffer(1×)重悬细胞，4℃ 600g 离心 3～4min，沉淀细胞，弃上清。

f. 再用少量 JC-1 Buffer(1×)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，应先收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

a. 吸除 6 孔板培养液，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 1ml 细胞培养液，细胞培养液中可以含有血清和酚红。

b. 加入 1ml JC-1 染色工作液，充分混匀，细胞培养箱中 37℃孵育 20min。

c. 在孵育期间，按照每 1ml JC-1 Buffer(5×)加入 4ml 蒸馏水的比例，配制适量的 JC-1 Buffer(1×)，并放置于冰浴。

d. 37℃孵育结束后，吸除上清，用 JC-1 Buffer(1×)洗涤 2 次。

e. 加入 2ml 细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。

f. 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：

a. 把配制好的 JC-1 染色工作液再用 JC-1 Buffer(1×)稀释 5 倍。

b. 0.9ml JC-1 染色工作液中加入 0.1ml 总蛋白量为 10～100μg 纯化的线粒体。

c. 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，激发波长为 485nm，发射波长为 590nm；如果使用荧光酶标仪，激发波长不能设置为

485nm 时，可以在 475～520nm 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。

d. 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：

检测 JC-1 单体时可以把激发光设置为 490nm，发射光设置为 530nm；检测 JC-1 聚合物时，可以把激发光设置为 525nm，发射光设置为 590nm。注意：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。

注意事项：

1、JC-1 Stain(200×)应完全溶解混匀后使用，但应避免反复冻融，必须先把 JC-1 用 ddH_2O 充分溶解混匀后，才可加入 JC-1 Buffer(1×)；不可先配制 JC-1 Buffer(1×)再加入 JC-1 Stain(200×)，否则导致 JC-1 很难充分溶解，严重影响后续的检测。

2、对于 6 孔板中的样品，本试剂盒共可以检测 100 个样品；对于 12 孔中的样品，本试剂盒共可以检测 200 个样品。

3、装载完 JC-1 后用 JC-1 Buffer(1×)洗涤时，尽量使 JC-1 Buffer(1×)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 30min 内完成后续检测，在检测前需冰浴保存。

5、 勿把 JC-1 Buffer(5×)全部配制成 1×，因为操作过程中需直接使用 JC-1 Buffer(5×)。

6、 如 JC-1 Buffer(5×)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，有一定毒性，请注意小心防护。

8、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

9、 JC-1 Stain 和 CCCP(1mM)试剂量较少，请先 12000rpm 离心 1min 后再使用。

10、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期： 12 个月有效。低温运输，按要求保存。

相关产品:

产品编号	产品名称
GCCS0001	ACK 红细胞裂解液(ACK Lysis Buffer)
GCCS0201	细胞线粒体分离试剂盒
GCNR0001	DEPC 处理水(0.1%)
GCPW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
GCTE0003	碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(PNP 比色法)
GCTO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)