

Enhanced Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (JC-1)

增强型线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)

产品编号	产品名称	规格
BL1213A	增强型线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)	100T

产品简介:

线粒体膜电位检测试剂盒 (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。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, 可以产生红色荧光; 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。这样就可以非常方便地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, 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 515nm, 最大发射波长为 529nm; JC-1 聚合物的最大激发波长为 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设置即可。

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。本产品经优化处理, 极大提高了 JC-1 在溶液中的溶解性, 可以直接使用染色缓冲液进行配制, 轻轻吹打混匀即可用于细胞的荧光染色, 大大缩短实验时间, 并能增强染色效果。

对于 6 孔板中的样品, 按照每孔使用 1ml JC-1 染色工作液计算, 本试剂盒共可以检测 100 个样品。

产品组成:

产品编号	组分	规格
BL1231A-1	JC-1(200×)	100μL×5
BL1231A-2	JC-1 染色缓冲液	400mL
BL1231A-3	CCCP(10mM)	20μL

使用方法:

一. JC-1 染色工作液的配制

6 孔板每孔所需 JC-1 染色工作液的量为 1mL, 其他培养器皿的 JC-1 染色工作液的用量以此类推; 对于细胞悬液每 50~100 万细胞需 0.5mL JC-1 染色工作液。取适量 JC-1 (200×), 按照每 5μL JC-1 (200×) 加入 1mL JC-1 染色缓冲液的比例稀释 JC-1, 反复吹打混匀后即为 JC-1 染色工作液。

二. 阳性对照的设置:

把试剂盒中提供的 CCCP (10mM) 推荐按照 1:1000 的比例加入到细胞培养液中, 稀释至 10μM, 处理细胞 20 分钟。对于大多数细胞, 通常 10μM CCCP 处理 20 分钟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决定。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



三. 对于悬浮细胞

1. 取 10~60 万细胞，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。
2. 加入 0.5mL JC-1 染色工作液，颠倒混匀数次。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 分钟。
3. 37°C 孵育结束后，600g 4°C 离心 3~4 分钟，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸出细胞。
4. 用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次：加入 1mL JC-1 染色缓冲液重悬细胞，600g 4°C 离心 3~4 分钟，沉淀细胞，弃上清。再加入 1mL JC-1 染色缓冲液重悬细胞，600g 4°C 离心 3~4 分钟，沉淀细胞，弃上清。
5. 再用适量 JC-1 染色缓冲液（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。

四. 对于贴壁细胞

1. 对于 6 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 1mL 细胞培养液。细胞培养液中可以含有血清和酚红。
2. 加入 1mL JC-1 染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 分钟。
3. 37°C 孵育结束后，吸除上清，用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次。
4. 加入 2mL 细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。
5. 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。注意：对于贴壁细胞，如果用荧光分光光度计或流式细胞仪检测，先收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

五. 对于纯化的线粒体

1. 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。
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），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，也可以参考步骤六的波长设置进行荧光检测。
3. 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察：方法同下面的步骤六。

六. 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（200×）在 4°C、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可以在 20~25°C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
2. JC-1 染色工作液加入并洗涤后尽量在 30 分钟内完成后续检测；在检测前需冰浴保存。
3. JC-1 染色缓冲液须在无菌环境中使用，如有微生物污染可能会严重影响染色效果。
4. CCCP 为线粒体电子传递链抑制剂，有毒，请小心防护。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：

-20°C 避光保存，尽量避免反复冻融，有效期一年。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

