



## 线粒体膜电位检测试剂 (JC-1)

### 货号: C0008

**产品描述:** 线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件。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。分子式: C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>4</sub>。JC-1染料具有单体 (monomer form) 和聚合物 (J-aggregate form) 两种形式, 以电势依赖性方式积聚在线粒体内。在正常线粒体内, JC-1聚集在线粒体基质中形成聚合物, 聚合物发出强烈的红色荧光 (Ex=585nm, Em=590 nm); 不健康的线粒体由于膜电位的下降或丧失, JC-1则以单体形式存在于胞浆中, 产生绿色荧光 (Ex=514 nm, Em=529 nm)。通过JC-1从红色荧光向绿色荧光的转变可以很容易地检测到细胞膜电位的下降, 该转变也作为细胞凋亡早期的一个检测指标。JC-1不仅可用于定性检测, 根据颜色的变化非常直接的反映出线粒体膜电位的变化。也可以用于定量检测, 根据红绿荧光强度的比例来衡量线粒体的去极化程度。

#### 产品组成:

组分	规格1	规格2	储存和效期
	100T	50T	
JC-1荧光探针 (5mg/ml)	100ul	50ul	-20°C避光保存, 一年有效
稀释缓冲液 (10X)	10ml	5ml	2-8°C保存, 一年有效

**所需设备:** 激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、荧光显微镜、荧光酶标仪等

**适用范围:** 检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位

#### 操作步骤:

##### JC-1检测工作液配制

取适量JC-1荧光探针, 按照每10ul JC-1荧光探针加入4.5ml超纯水的比例进行稀释, 剧烈震荡并充分溶解荧光探针。之后加入0.5ml稀释缓冲液 (10X), 混匀后即**为JC-1检测工作液**, 浓度为10  $\mu$ g/ml。

##### 细胞样本

于6、12或24孔板上进行细胞铺板, 密度为 $5 \times 10^5$  cells/ml。37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养过夜。选择合适的化合物根据特定的步骤进行凋亡诱导。注: 进行凋亡诱导时, 细胞密度建议不超过 $1 \times 10^6$  cells/ml, 也可根据不同细胞类型培养至合适密度。

#### 1. 流式细胞仪检测

##### 悬浮细胞

- 1) 取0.5ml细胞悬液至无菌离心管内, 用PBS洗涤两次, 室温1000rpm离心5min, 收集细胞。
- 2) 取0.5ml JC-1检测工作液重悬细胞, 于37°C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育15-30min。 (**注意: 一般情况15min足以进行充分染色**)
- 3) 室温1000rpm离心5min, 收集细胞。
- 4) 用1.5ml新鲜细胞培养液重悬细胞, 室温1000rpm离心5min, 收集细胞, 重复一次。
- 5) 用0.5ml新鲜培养液重悬细胞, 进行后续流式分析。 (**注意: 请马上进行流式定量分析, 此细节很重要**)
- 6) 含有红色JC-1聚集物的健康细胞线粒体用FL2通道检测; 含有绿色JC-1单体的凋亡或不健康细胞用FL1 (FITC) 通道检测。

##### 贴壁细胞 (建议先收集细胞, 重悬后参考悬浮细胞检测方法)



## 2. 荧光显微镜检测

### 悬浮细胞

- 1) 样本处理步骤同使用流式细胞仪进行线粒体膜电位检测 (1) ~ (4) 步骤。
- 2) 用0.3ml新鲜细胞培养液重悬细胞, 即可进行荧光显微镜检测。**(注意: 请马上进行荧光显微分析)**
- 3) **数据分析:** 健康细胞线粒体内, JC-1聚集形成聚合物, 呈现红色荧光(最大发射波长为590nm)。凋亡或坏死细胞内JC-1以单体形式存在, 线粒体呈绿色荧光(最大发射波长为530nm)。然后计算红色荧光信号与绿色荧光信号的比值, 判断细胞健康程度。

### 贴壁细胞

- 1) 培养皿内用盖玻片进行细胞爬片或细胞培养在腔室玻片(chamber slide)上。选择合适的化合物根据特定的步骤进行凋亡诱导。(或细胞铺板凋亡诱导处理后, 收集细胞, 参考悬浮细胞处理方法, 检测线粒体膜电位)
- 2) 吸掉培养液, 加入足够覆盖所有细胞的JC-1检测工作液。于37°C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育15-30min **(注意: 一般情况 15 min足以进行充分染色)**。
- 3) 吸掉培养液, 然后用新鲜细胞培养液洗涤细胞2次。
- 4) 于荧光显微镜或者共聚焦显微镜下观察。**数据分析同悬浮细胞。**

## 3. 荧光酶标仪检测

### 悬浮细胞

- 1) 样本处理步骤同使用流式细胞仪进行线粒体膜电位检测 (1) ~ (4) 步骤。
- 2) 用0.3ml新鲜细胞培养液重悬细胞; 然后按照每孔100 μl的量将JC-1检测工作液的细胞转移到96孔板内(96孔板请避光), 即可进行荧光酶标板分析。**(注意: 请马上进行荧光显微分析)**

### 贴壁细胞

- 1) 培养皿内用盖玻片进行细胞爬片或细胞培养在腔室玻片(chamber slide)上。选择合适的化合物根据特定的步骤进行凋亡诱导。(或细胞铺板凋亡诱导处理后, 收集细胞, 参考悬浮细胞处理方法, 检测线粒体膜电位)
- 2) 用0.3ml新鲜细胞培养液重悬细胞; 然后按照每孔100μl的量将JC-1检测工作液的细胞转移到96孔板内(96孔板请避光), 即可进行荧光酶标板分析。**(注意: 请马上进行荧光显微分析)**

### 组织样本

可采用单细胞悬液制备仪或传统的组织处理方法如: 酶解法、研磨法等制备单细胞悬液, 然后可参照悬浮细胞操作步骤加入JC-1荧光探针进行后续操作。

### 纯化后的线粒体

将0.5ml JC-1检测工作液加入到100ul总蛋白量为10-100ug纯化的线粒体中, 于37°C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育10-20min, 进行荧光分析。

## 产品说明:

1. 工作液需用前配制: 将冻存的JC-1荧光探针置于室温充分融化, 离心后使用。配制检测工作液时, 必须用超纯水充分溶解探针后, 再加入稀释缓冲液, 否则会导致探针难以溶解。
2. JC-1对光敏感, 所有操作步骤的应避免强光。
3. 操作完成后, 应立即进行后续的结果分析, 非常必要。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。