

JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒

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，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。

本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进行检测，同时提供了 CCCP 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。

应用范围

线粒体荧光染料

产品货号

J6004S/J6004L

储运条件

-20℃避光冷藏，其中 B 组份也可 4℃保存。为避免反复冻融，A 与 C 组份建议分装。有效期见外包装；冰袋运输。

产品特点

信号准确：提供阳性药物做对照；

方便快捷：染料是液体稀释，无需再溶解。

产品组分

组分	J6004S (20 T)	J6004L (100 T)
A. JC-1, 100×in DMSO	100 μ L	500 μ L
B. 10×Assay Buffer	5 mL	25 mL
C. CCCP, 50 mM	10 μ L	50 μ L

产品参数

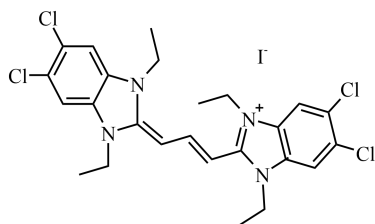
单体 Ex/Em: 510/527 nm

聚合物 Ex/Em: 585/590 nm

分子式: C₂₅H₂₇Cl₄IN₄

分子量: 652.2

分子结构图:



注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- JC-1(100×in DMSO)在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 20~25℃水浴温育片刻至全部融解后使用。
- 在配制溶液前，若发现组分 B 有析出，一定要先水浴加热处理，确保完全溶解再使用。
- 配制 JC-1 染色工作液时，必须先把试剂盒提供的 JC-1(100×in DMSO)用灭菌 diH₂O 充分溶解混匀后，才可以加入 10×Assay Buffer。不可先配制 1×Assay Buffer 再加入 JC-1(100×in DMSO)，这样 JC-1 会很难充分溶解，会严重影响后续的检测。若出现沉淀，可 37℃加热处理。
- 工作液配制完成后，一定要及时孵育细胞，避免工作液产生沉淀。
- 染色完成后用 1×Assay Buffer 洗涤时，使 1×Assay Buffer 保持 4℃左右，此时的洗涤效果较好。
- JC-1 染色并洗涤完成后尽量在 30 min 内完成后续检测。在检测前需冰浴保存。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 离心机升速和降速过高会引起细胞的损失，为保证细胞的得率和状态，建议离心时调整离心机升速不大于 3，降速不大于 2，即 Acc≤3，Dec≤2。

自备材料

1. 耗材

细胞培养板

2. 仪器

流式细胞仪、荧光显微镜、荧光酶标仪、荧光分光光度计、激光共聚焦显微镜

操作步骤

1. 试剂准备

(1)配制 JC-1 工作液

按如下方案配制 1 mL 1×JC-1 染色工作液：

取 10 μ L 100×JC-1 染色液，加入到 890 μ L 灭菌的 ddH₂O 中，涡旋混匀，向上述混合液中加入 100 μ L 10×Assay Buffer，涡旋混匀，即可得到 1×JC-1 染色液。

注：1)配制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。

(2)配制 1×Assay Buffer

按照 10×assay buffer: ddH₂O = 1: 9 的比例配制 1×assay buffer，如 1 mL 10×assay buffer + 9 mL ddH₂O。

2. 染色

开始实验之前，请确保 JC-1 和 CCCP 溶液已恢复至室温。

(1)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：把试剂盒中提供的 CCCP(50 mM)推荐按照 1: 1000 的比例加入到细胞培养液中(如终浓度为 50 μ M 即 1 μ L 50 mM 的 CCCP 溶液加入至 1 mL 细胞培养液中)，37℃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. 对于悬浮细胞

(1)取 5×10^5 个细胞，重悬于 0.5 mL 细胞培养液中，细胞培养液中可以含血清和酚红。

(2)加入 0.5 mL JC-1 染色工作液，颠倒数次混匀。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 min。

(3)孵育结束后，4°C 1000 rpm 离心 5 min，弃上清（注意尽量不要吸除细胞）。

(4)加入 1 mL 预冷的 1×Assay Buffer 重悬细胞，4°C 1000 rpm 离心 5 min，去除上清，重复一次。

(5)再用适量预冷的 1×Assay Buffer 重悬，用荧光显微镜观察，也可以用流式细胞仪分析。

注：上述方式适用于细胞毒性耐受性较差的敏感细胞株；对于耐受性较好的细胞株，可在细胞收集离心后，弃上清，直接用 JC-1 染色工作液重悬细胞沉淀进行染色实验。

4. 对于贴壁细胞

注：对于贴壁细胞，如果希望采用流式细胞仪检测，可以先收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。以下贴壁细胞对于荧光显微镜或荧光酶标仪的检测流程。请注意：细胞状态会直接影响实验结果。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，从而影响染色结果。

(1)对于六孔板的一个孔，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 1 mL 细胞培养液。细胞培养液中可以含血清和酚红。

(2)加入 1 mL JC-1 染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 min。

(3)孵育结束后，吸除上清，加入 1 mL 预冷的 1×Assay Buffer，吸除上清，重复一次。

(4)加入 2 mL 细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红，用荧光显微镜下观察，也可以用荧光酶标仪检测。

注：上述方式适用于细胞毒性耐受性较差的敏感细胞株；对于耐受性较好的细胞株，可在细胞收集离心后，弃上清，直接用 JC-1 染色工作液重悬细胞沉淀进行染色实验。

5. 纯化后的线粒体

(1)0.9 mL JC-1 染色工作液中加入 0.1 mL 总蛋白量为 10~100 μg 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)，

(3)激发波长为 485 nm，发射波长为 590 nm。如果使用荧光酶标仪，激发波长不能设置为 485 nm 时，可以在 475~520 nm 范围内设置激发波长。

(4)用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察。

6. 结果分析

(1)流式细胞仪分析

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。

(2)荧光显微镜分析

1)采用可以同时检测 FITC 和罗丹明，或者 FITC 与 Texas Red 的双通道滤波器荧光显微镜观察细胞。

2)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；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。

(3)荧光酶标仪分析

1)红色荧光：Ex/Em: 550/600 nm；绿色荧光：Ex/Em: 485/535 nm。

2)计算红绿荧光比值：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。

表1 JC-1细胞染色条件

Method	Cell Type	Adherent	Incubation Conditions
--------	-----------	----------	-----------------------

			Dye Concentration	Temperature	Time
Microscope	Neurons (rat)	Adherent	2.0 $\mu\text{g/mL}$	37°C	20~30 min
	Neurons (rat)	Adherent	1.0 $\mu\text{g/mL}$	37°C	20 min
	O-2A Oligodendrocytes (rat)	Adherent	10 $\mu\text{g/mL}$	37°C	10 min
	PC12	Adherent	10 $\mu\text{g/mL}$	37 °C	10 min
	Cardiac Myocytes (rat)	Dissociated	10 $\mu\text{g/mL}$	37 °C	10 min
Flow Cytometer	Human Fibroblasts	Dissociated	0.3 $\mu\text{g/mL}$	37 °C	1 hour
	Colo-205	Dissociated	10 $\mu\text{g/mL}$	37 °C	10 min
	U937	Dissociated	10 $\mu\text{g/mL}$	22 °C	10 min

(4)染色效果图 (图 1)

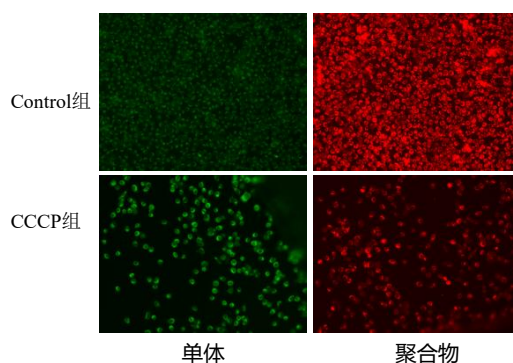


图1 JC-1染色效果图

FAQ

1. 问：在测线粒体膜电位时，未处理的细胞也会发出荧光，而且在试验样品中为什么没有看到显著差异？

答：无论您使用四甲基罗丹明甲酯(TMRM)还是 MitoTracker Red FM，未处理的细胞都会发出荧光。只要细胞线粒体膜电位降低就会导致荧光信号降低，最重要的是变化的程度。当线粒体膜电位发生改变时，JC-1 染料不仅强度改变，还有激发和发射比例光谱的改变。设置未处理的对照和用线粒体膜电位去稳定剂（如 CCCP 或 FCCP）处理的阳性对照是非常重要的。还有一种可能是，这些染料仅用于活细胞，如果是固定处理的细胞则无法保留相同程度的信号。

2. 问：用 PFA 固定是否可行（现场成像后，用于储存）？这会干扰染料信号吗？

答：如果您想保持 JC-1 染料和固定后检测到的线粒体膜电位之间的关系，这是不可能的，这是因为 JC-1 依赖于线粒体膜电位，而固定会消除线粒体膜电位。

3. 问：请问做 JC-1 培养板该如何选择？比如用酶标仪检测吸光度的话是否一定需要在避光培养板中做？普通的透明板可以吗？如果用荧光显微镜观察拍照的话又应该用什么板呢？

答：荧光酶标仪检测的话要选用黑色的酶标板，荧光显微镜拍照的话可以用透明的板子。

4. 问：本产品适用于那些样本检测？

答：活细胞或者纯化后的线粒体。组织样本只能先做线粒体纯化，才能做后续染色。

5. 问：染完后，用抗淬灭剂封片后用免疫荧光显微镜观察，镜下观察到细胞会移动，拍出来的照片是模糊的，出现这种情况的原因是什么？该怎么解决？

答：原因可能是细胞没固定，一般可以在孔板里染色后直接用倒置显微镜在孔板里观察，不用封片。

6. 问：JC-1 配制工作液的时候出现明显沉淀或者沾壁的情况，该如何解决？

答：JC-1 染料在有机溶剂的溶解度明显高于无机溶剂，并且受温度影响。建议配制工作液的时候 Assay buffer 和超纯水可以进行提前预热，注意顺序，工作液现配现用。或者可以添加 0.04% 的 Pluronic® F-127（或者类似功能的试剂）促进溶解度。

7. 问：染料洗不干净怎么办？

答：请使用预冷的 PBS 进行清洗 3 遍，每次 5 min。

8. 问：JC-1 导致细胞出现死亡的情况，怎么改善？

答：细胞对于毒性的敏感程度不同，可以适当调整 JC-1 的浓度。

同系列产品

产品货号	产品名称	选购指南
J6004S	JC-1线粒体膜电位检测试剂盒	具有JC-1染料优势；试剂盒中提供 CCCP 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照
J4001	JC-1线粒体荧光探针	JC-1从红色荧光到绿色荧光的转变可以很容易地检测线粒体膜电位的下降，同时作为细胞凋亡早期的检测指标
M4063	MitoScene™ Green I (线粒体绿色荧光探针)	1. 纳摩尔水平对线粒体进行染色标记 2. 在线粒体膜上积累而呈现明亮的荧光 3. M4064是M4063升级款
M4064	MitoScene™ Green II (线粒体绿色荧光探针II)	
M4067	MitoScene™ Red CMXRos (线粒体红色荧光探针)	可以染色后固体也可以染色活细胞
M4045	MitoScene™ Far-red (线粒体远红外荧光探针)	可在线粒体中积累，方便用于检测细胞凋亡过程中线粒体膜电位的变化
N4002	NAO (壬基吖啶橙)	可在活细胞中用作线粒体荧光探针，也能对线粒体进行定位研究以及监测线粒体的完整性
R4056	Rhodamine 123 (罗丹明123)	可用于培养的细胞或从组织中线粒体的膜电位的检测
T4057	TMRE (四甲基罗丹明乙酯)	/
T4058	TMRM (四甲基罗丹明甲酯)	/
D4015	DASPEI线粒体荧光探针	/