

## JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒说明书

### 产品描述

JC-1 是一种阳离子羰花青染料，能够穿过细胞膜，在线粒体膜电位的作用下向线粒体聚集定位，是广泛用于检测线粒体膜电位的理想荧光探针。当线粒体膜电位较高时，JC-1 在线粒体膜电位作用下聚集在线粒体的基质中，其主要以聚合物(J-aggregates)的形式存在，呈现出红色荧光( $Ex=585\text{ nm}$ ,  $Em=590\text{ nm}$ )；当细胞状态不好，线粒体膜电位下降或者丧失，会导致 JC-1 大多以单体(Monomer)的形式存在于胞浆中，呈现出绿色荧光( $Ex=514\text{ nm}$ ,  $Em=529\text{ nm}$ )。因此，可以根据荧光颜色的红绿转化以及比例变化来判断线粒体膜电位变化情况，而线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个重要标志。

JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit) 是一种以 JC-1 荧光探针为主的试剂盒，本试剂盒对 JC-1 易析出等缺点进行了改良，并在试剂盒中提供了相关试剂，可用于快速灵敏地检测细胞或纯化的线粒体膜电位变化，用于判断早期的细胞凋亡，也是用来检测细胞早期凋亡的常用方法。本试剂盒共可以检测 100 个 6 孔板样品；此外，本试剂盒中还提供 CCCP(Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) 试剂，是一种线粒体中氧化磷酸化的质子载体(氢离子载体)和解耦体，能够促使线粒体对氢离子的通透性发生变化，导致线粒体膜电位下降或者丧失，可作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。

### 储存与运输

冰袋运输； $-20^{\circ}\text{C}$ 保存；JC-1(500 $\times$ )需避光保存，避免反复冻融；JC-1 染色缓冲液(10 $\times$ )和 JC-1 稀释液可  $4^{\circ}\text{C}$ 保存；有效期 12 个月。

## 产品组成

产品名称	产品含量
JC-1(500×)	4×50μl
JC-1 染色缓冲液(10×)	50 mL
JC-1 稀释液	100 mL
CCCP(100 mM)	50 μL
产品说明书	一份

## 操作步骤

### 1. JC-1 染色工作液以及 JC-1 染色缓冲液配制:

- a. 取 2 μL JC-1 溶液(500×)与 900 μL JC-1 稀释液充分混匀, 然后再加入 100 μL JC-1 染色缓冲液(10×), 旋涡震荡混匀, 配制成 JC-1 染色工作液备用。
- b. 取适量 JC-1 染色缓冲液(10×)用去离子水稀释配制成 1×JC-1 染色缓冲液备用(后续步骤如无特殊说明, 洗涤等步骤均使用 1×JC-1 染色缓冲液)。

### 2. 阳性对照组设置:

- a. 取适量 CCCP(100 mM)用细胞培养液稀释 1000 倍得到 100 μM CCCP 工作液;
- b. 用 CCCP 工作液孵育细胞 30 min 左右, 随后按照下方的 JC-1 染色步骤操作检测线粒体膜电位。

### 3. 悬浮细胞染色操作:

- a. 取  $1-6 \times 10^5$  细胞, 1000 g 离心 3-5 min 去除原有培养基, 加入 JC-1 染色缓冲液洗涤 1 次后, 再离心去除 JC-1 染色缓冲液, 用 500 μL 细胞培养基重悬(可含血清和酚红)。
- b. 然后加入 500 μL JC-1 染色工作液, 避光于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 30 min。
- c. 孵育结束后, 依旧按常规悬浮细胞的处理方法, 离心去除 JC-1 染色工作液后, 用 JC-1

染色缓冲液洗涤 2 次。

d. 适量 JC-1 染色缓冲液(1×)或细胞培养液(建议不含酚红)重悬后, 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察, 也可使用流式细胞仪等仪器分析。

#### **4. 贴壁细胞染色操作(6 孔板为例):**

对于贴壁细胞, 如需用流式细胞仪检测, 可先收集细胞, 重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

a. 去除原有含药物或其他处理的细胞培养基后, 加 1 mL JC-1 染色缓冲液, 洗涤 1-2 次。

b. 加入 1 mL 细胞培养基(可含血清和酚红)。

c. 加入 1 mL JC-1 染色工作液, 轻晃混匀, 避光于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 30 min。

d. 孵育结束后, 吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲液, 洗涤 2 次。

e. 加入 2 mL JC-1 染色缓冲液(1×)或细胞培养液(建议不含酚红)。

e. 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察或用流式细胞仪等仪器分析。

#### **5. 对于提取纯化的线粒体**

a. 900 μL JC-1 染色工作液中加入 100 μL 总蛋白量为 10-100 μg 纯化线粒体。

b. 混匀后使用荧光分光光度计(激发波长为 485 nm, 发射波长为 590 nm)或酶标仪(当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)等仪器进行扫描检测, 也可通过荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察, 可参考步骤 6 中的波长设置进行检测。

#### **6. 荧光检测与分析**

a. 检测 JC-1 单体的波长参数为 Ex=514 nm, Em=529 nm; JC-1 聚合物的波长参数为 Ex=585 nm, Em=590 nm。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, 参数设置可以依情况在这参数左右进行一个调整。

b. 荧光显微镜拍照时, 建议以正常组为标准, 确定红色和绿色荧光的曝光时间, 以正常组

红色荧光效果清晰，绿色荧光效果较暗为佳，并分别以正常组的红色与绿色荧光的曝光时间去拍摄处理组荧光。

c. 对结果的判断：细胞状态正常，主要呈现红色荧光，表明其线粒体膜电位正常；如果出现绿色荧光大幅度增强，说明线粒体膜电位出现下降，其可能处于细胞凋亡早期阶段。

## 注意事项

1. JC-1 溶液、JC-1 染色缓冲液(10×)如有沉淀生产，可以适当温浴溶解。
2. 为了使 JC-1 充分溶解，请按照操作顺序进行 JC-1 工作液配制
3. JC-1 孵育过后的样品，建议 30 min 内检测完毕。
4. JC-1 最终检测时，建议使用不含酚红的细胞培养液，避免造成背景色干扰，JC-1 染色孵育阶段酚红对结果无影响。
5. 如每次使用的 JC-1 溶液较少，可能要涉及多次的反复冻融，请视情况分装，尽量避免 JC-1 溶液多次反复冻融。
6. 操作时请穿实验服，佩戴一次性手套。