

线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1 法）

货号：PMK0996

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：50T/100T

适用样本：细胞

产品简介

线粒体是真核细胞产生能量的场所，具有双层膜结构，包括线粒体外膜以及折叠的内膜。在完整线粒体内膜上有一个电压梯度即膜电位，外正内负。线粒体跨膜电位破坏是细胞凋亡发生后最早发生的细胞内变化之一。本试剂盒可用于检测线粒体跨膜电位的变化，为鉴别正常细胞和凋亡细胞提供了一种简便的方法。原理是基于 JC-1 线粒体荧光探针，在线粒体膜电位较高时，JC-1 线粒体荧光探针聚集在线粒体的基质(matrix)中，形成聚合物(J-aggregates)，可以产生红色荧光 (Ex/Em= 585/590)；在线粒体膜电位较低时，JC-1 线粒体荧光探针不能聚集在线粒体的基质中，此时 JC-1 线粒体荧光探针为单体(monomer)，可以产生绿色荧光 (Ex/Em= 510/527nm)。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。JC-1 线粒体荧光探针可以作为多种细胞的线粒体膜电位指标，包括肌细胞和神经元，以及完整的组织或分离的线粒体。本试剂盒包含 CCCP，它能使质子梯度解偶联，可作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	50T	100T	
JC-1 线粒体荧光探针(250×)	110 μL	220 μL	-20℃，避光保存
CCCP(50mM)	60 μL	120 μL	-20℃
PBS(10×)	30mL	60mL	4℃

自备耗材

荧光显微镜或流式细胞仪
细胞培养板、可调节式移液枪及枪头
离心机、37℃，5% CO₂细胞培养箱
超纯水

试剂准备

JC-1 线粒体荧光探针(250×)：使用前，平衡到室温；避光放置；试剂分装-20℃保存避免反复冻融。

CCCP(50mM)：现用现配，冰上放置。按 1mL 培养基加入 1 μL CCCP(50mM)充分混匀的比例，用培养基配制，其终浓度为 50 μM。

PBS(10×)：使用前，平衡到室温，若有晶体析出，可 37℃加热溶解后使用。

染色液：现用现配，避光放置。按 4μL JC-1 线粒体荧光探针(250×)加入 900μL 超纯水溶解，随后加入 100μL PBS(10×)涡旋混匀的比例配制，根据样本数量计算需要配制的体积。

注意：1. 小管试剂开盖前，请先低速离心。

2. 请勿把 PBS(10×)全部配制成 1×PBS，本试剂盒使用过程中需直接使用 PBS(10×)。

3. JC-1 线粒体荧光探针在 4℃、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 20-25℃水浴温育片刻至全部融解后使用。

4. 为得到比较理想的结果，可根据细胞类型和实际染色效果对 JC-1 线粒体荧光探针在 250-2500 稀释倍数之间进行适当调整。对于 24 孔板，按推荐稀释倍数配制相关检测试剂，且每孔使用 0.5mL 染色液，此时本试剂盒的 50T 和 100T 分别可以检测 50 次和 100 次。

实验步骤

A 用流式细胞仪进行检测

1. 实验药物处理细胞，并设置阳性对照：阳性对照孔用 50 μ M CCCP 处理细胞，在 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 5min。

注意：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。

2. 配制 1 \times PBS：将 PBS (10 \times) 加入超纯水稀释成 1 \times PBS，根据样本数量计算需要配制的体积；4 $^{\circ}$ C 保存。

3. 收集细胞：对于非贴壁细胞，300g 离心 5min 收集 1 \times 10⁶ 个细胞，用 1 \times PBS 清洗 2 次。对于贴壁细胞，先用胰蛋白酶消化细胞，然后 300g 离心 5min 离心收集 1 \times 10⁶ 个细胞，用 1 \times PBS 清洗 2 次。

注意：建议保留未染色对照细胞（即不带 JC-1 染色），细胞悬浮在 1 \times PBS 中，使处理过的和未处理的样品都能通过流式细胞仪。

4. 弃去清洗细胞所用的 1 \times PBS，每孔中加入 0.5mL 染色液悬浮细胞，37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 细胞培养箱孵育 15-30min。

注意：1) 不同细胞染色时间不同。正式实验前，做预实验确定最佳孵育时间。2) 选择细胞状态好进行染色，以获得最佳实验结果。

5. 37 $^{\circ}$ C 孵育结束后，400g，4 $^{\circ}$ C 离心 3-4min，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。

6. 加入 1mL 预冷的 1 \times PBS 重悬细胞，400g，4 $^{\circ}$ C 离心 3-4min，沉淀细胞，弃上清，重复洗涤 1 次。

7. 将细胞重悬于 500 μ L 室温的 1 \times PBS 中，流式细胞仪立即分析细胞。在 FITC 通道（通常为 FL1），可检测到凋亡细胞中的 JC-1 单体，呈扩散绿色荧光。正常细胞中，JC-1 聚集体可在 PI 通道（通常为 FL2）中检测，呈点状红色荧光。

注意：染色后尽量在 30-60min 内完成上机检测。

B 用荧光显微镜检测

悬浮细胞，遵循流式细胞仪的方案 A1-7 步骤，将步骤 A7 收集的细胞悬液放置于载玻片上，用盖玻片盖住细胞。选择合适的滤光片对细胞进行荧光显微镜分析。

对于贴壁细胞：建议的方案如下所示（以 24 孔板为例，其他培养器皿以此类推）：

1. 24 孔细胞培养皿中直接培养细胞。在 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中，至少培养 24h，然后进行处理；

2. 实验药物处理细胞，并设置阳性对照：阳性对照孔用 50 μ M CCCP 处理细胞，在 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 5min。

注意：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. 配制 1 \times PBS：将 PBS (10 \times) 加入超纯水稀释成 1 \times PBS，根据样本数量计算需要配制的体积；4 $^{\circ}$ C 保存。

4. 用 1 \times PBS 清洗细胞 2 次，弃去 1 \times PBS。

5. 每孔中加入适当体积的染色溶液悬浮细胞，通常 96 孔板每孔加入 0.1mL，24 孔板每孔加入 0.5mL，12 孔板每孔加入 1mL，6 孔板每孔加入 2mL。37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 细胞培养箱孵育 15-30min。

注意：1) 不同细胞染色时间不同。正式实验前，做预实验确定最佳孵育时间。2) 选择细胞状态好进行染色，以获得最佳实验结果。

6. 37 $^{\circ}$ C 孵育结束后，吸除上清，用 1 \times PBS 洗涤 2 次。

7. 加入 500 μ L 室温的 1 \times PBS，在荧光显微镜下观察细胞。

注意：酚红不干扰 JC-1 染色。染色后尽量在 30min 内完成拍照，在检测前需冰浴保存。

相关产品：

PMK0872 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒（增强型）

PMK0988 Annexin V-fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒

PMK0997 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

PMK0998 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）

更多产品详情了解，请关注公众号：

