

# 细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)

## JC-1 Apoptosis Detection Kit

说明书修订日期: 2018.10.24

Cat number: KGA601-KGA604

Store at -20℃ for 12 months

For Research Use Only (科研专用)

### 一、试剂盒说明

大量的研究表明线粒体与细胞凋亡密切相关, 其中线粒体跨膜电位 ( $\Delta\psi$ ) 的破坏, 被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件之一, 它发生在细胞核凋亡特征 (染色质浓缩、DNA 断裂) 出现之前, 一旦线粒体跨膜电位崩溃, 则细胞凋亡不可逆转。

本试剂盒采用 JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide)一种阳离子脂质荧光染料作为检测线粒体跨膜电位指示剂。JC-1 有单体和多聚体两种存在状态, 在低浓度时以单体的形式存在, 高浓度时以多聚体形式存在, 两者的发射光谱不同, 但均可在流式细胞仪绿色 (FL-1) 通道检测出绿色荧光, JC-1 可透过正常细胞膜以单体状态聚集胞内, 正常健康线粒体的膜电位 ( $\Delta\psi$ ) 具有极性, JC-1 依赖于  $\Delta\psi$  的极性被迅速摄入线粒体内, 并因浓度增高而在线粒体内形成多聚体, 多聚体发射光为红色荧光; 可被流式细胞仪的红色 (FL-2) 通道检测到, 而细胞发生凋亡时, 线粒体跨膜电位被去极化, JC-1 从线粒体内释放, 红光强度减弱, 以单体的形式存在于胞质内发绿色荧光。根据这一特征检测线粒体膜电位的变化。

本试剂盒可应用于细胞、组织或纯化的线粒体膜电位检测。

### 二、试剂盒组份

| 组份                   | KGA601<br>10 assays | KGA602<br>20 assays | KGA603<br>50 assays | KGA604<br>100 assays | 储存条件    |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------|
| JC-1                 | 10 $\mu$ L          | 20 $\mu$ L          | 50 $\mu$ L          | 100 $\mu$ L          | -20℃,避光 |
| 10×Incubation Buffer | 2mL                 | 4mL                 | 10mL                | 20mL                 | 2-8℃    |

### 三、试剂盒以外自备仪器和试剂

流式细胞仪或荧光显微镜、高速离心机、CO<sub>2</sub> 培养箱、微量移液器

1.5ml Microtube、载玻片、盖玻片 (荧光显微镜观察需用)、PBS、灭菌去离子水

### 四、使用注意事项

1. 微量试剂取用前请离心集液。
2. JC-1 避光保存及使用。
3. 细胞培养至汇合度 80-90%, 收集细胞量在  $1 \times 10^6$ /Test。
4. 对 pH 变化过于敏感的细胞建议用胎牛血清取代 Buffer 孵育染色及洗涤, 或延长观测时间。

5. 流式细胞仪检测线粒体膜电位变化受到多种因素的影响，因诱导剂、细胞株类型，作用时间的不同而荧光强度比例都有不同，因此没有通用标准的补偿设门指南，因此每个试验需设阴性及阳性对照组进行荧光补偿及设门。
6. 组织需先制备单细胞悬液或提取纯化线粒体后方可进行检测，可选用凯基细胞悬液制备试剂盒（KGA829）或线粒体提取试剂盒（KGA827）。

## 五、操作方法

1. 用适当的方法诱导细胞凋亡，同时设立阴性对照组和阳性对照组【用适当的凋亡诱导剂（如星形孢菌素，staurosporine），诱导适当时间后经其它检测（如 AnnexinV 或 Caspase 3 活性）证实确有凋亡产生】，收集细胞；
2. **JC-1 工作液的配置：**取 2 $\mu$ L JC-1（500 $\times$ ），加入 900 $\mu$ L 灭菌去离子水中，剧烈 Vortex 充分溶解并混匀 JC-1。然后加入 100 $\mu$ L 10 $\times$  Incubation Buffer，混匀后即为 1 mL 的 JC-1 工作液。注：对于细胞悬液每 50-100 万细胞需 500  $\mu$ L JC-1 工作液。对于六孔板每孔需要 1 mL 的 JC-1 工作液，其它培养器皿的 JC-1 工作液的用量以此类推；
3. 1 $\times$ Incubation Buffer 的配置：取 100 $\mu$ L 10 $\times$  Incubation Buffer 加 900 $\mu$ L 灭菌去离子水稀释成 1 $\times$  Incubation Buffer，混匀并预热至 37 $^{\circ}$ C 备用；

### 对于悬浮细胞

1. 取  $1 \times 10^5 \sim 10^6$  细胞，用 PBS 洗涤细胞二次（离心 2000rpm，5min）；
2. 取 500 $\mu$ L JC-1 工作液将细胞均匀悬浮，37 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 15~20min；
3. 室温离心（2000rpm，5min）收集细胞，用 1 $\times$  Incubation Buffer 洗两次：加入 1 mL 1 $\times$  Incubation Buffer 重悬细胞，离心收集细胞，再次加入 1 mL 1 $\times$  Incubation Buffer 重悬细胞，离心收集细胞；
4. 吸取 500 $\mu$ L 1 $\times$  Incubation Buffer 重新悬浮细胞；
5. 荧光显微镜观察、荧光酶标仪或流式细胞仪分析。

**对于贴壁细胞**（若希望采用荧光酶标仪或流式细胞仪检测，建议先收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法）

1. 对于六孔板，吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞一次；
2. 加入 1mL JC-1 工作液，将细胞均匀覆盖，37 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 15~20min；
3. 吸除上清，用 1 $\times$  Incubation Buffer 洗两次；
4. 加入 1-2 mL 细胞培养液（可含血清和酚红）；
5. 荧光显微镜观察或激光共聚焦拍照分析。

### 对于纯化的线粒体

1. 把配置好的 JC-1 工作液用 1 $\times$  Incubation Buffer 稀释 5 倍；
2. 向 900 $\mu$ L 稀释后的 JC-1 工作液中加入 100 $\mu$ L 总蛋白量为 10-100 ug 的纯化的线粒体，37 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 10~20min；
3. 荧光显微镜观察、激光共聚焦拍照或荧光酶标仪分析。

## A. 荧光显微镜观察

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。

正常细胞：双色滤光片观察则为：绿++ 红++（高绿高红），如在同一滤光片下观察则为黄绿色  
凋亡细胞：双色滤光片观察则为：绿++ 红+（高绿低红）， 如在同一滤光片下观察则为绿色

### B.流式细胞仪分析

用流式细胞仪检测（Ex=488 nm; Em=530 nm）细胞凋亡的情况，绿色荧光通过 FITC 通道通常为 FL1 来检测；红色荧光通过 PI 通道通常为 FL2 来检测。

正常细胞{FL-1 亮,FL-2 亮; R1}，凋亡细胞 {FL-1 亮, FL-2 暗; R2}，设门的位置根据细胞种类、实验条件等不同而变化，试验需设未经处理的正常细胞为阴性对照组和阳性对照组，根据阴性和阳性对照组的双参数散点图来设定门的位置。

### C.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。

## 六、实验范例

用凋亡诱导剂诱导 P388 细胞凋亡，在 37<sup>0</sup>C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4~6h，利用凯基细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）进行检测，通过流式细胞仪分析分析结果如下。

