产 品 说 明 书

JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒

产品货号：J6004S, J6004L

产品规格：20T, 100T

产品内容：

组分	J6004S (20T)	J6004L (100T)
A: JC-1, 100× in DMSO	100 μL	500 μL
B: 10× Assay Buffer	2 ×1 mL	10 mL
C: CCCP, 50 mM	10 μL	50 μL

储存条件

-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。

光谱特性

Ex/Em：510/527 nm （单体物，绿色）

585/590 nm （聚合物，红色）

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酯酰丝氨酸外翻与 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，从而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△ Ψm 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，此时 JC-1 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。

JC-1 单体的最大激发波长为 510 nm，最大发射波长为 527 nm；JC-1 聚合物的最大激发波长为 585 nm，最大发射波长为 590 nm。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。

使用方法

1. 试剂准备

配制 JC-1 工作液

本产品仅用于科研

UElandy Inc.
Tel:0512-88965152
Web:www. uelandy.com

按如下方案配置 1 mL 1×JC-1 染色工作液：取 10 μL 100×JC-1 染色液，加入到 890 μL 灭菌的 diH_2O 中，涡旋混匀，向上述混合液中加入 100 μL 10×Assay Buffer，涡旋混匀，即可得到 1×JC-1 染色液。

注：①配置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。

配制 1×Assay Buffer

按照 10×assay buffer ： diH_2O = 1 : 9 的比例配置 1×assay buffer，如 1 mL 10×assay buffer + 9 mL diH_2O。

2. 细胞染色

开始实验之前，请确保 JC-1 和 CCCP 溶液已恢复至室温。

（1）按实验所需，在培养板中接种细胞（悬浮细胞不要超过 10^6 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 μM 即 1 μL 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。

对于悬浮细胞：

（3）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。

（4）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℃孵育 20 min。

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

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

（7）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。

对于贴壁细胞：

注意：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。以下为贴壁细胞对于荧光显微镜或荧光酶标仪的检测流程。

（3）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 1mL 细胞培养液。细胞培养液中可以含有血清和酚红。

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

（5）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。

（6）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。

3. 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

a．采用可以同时检测荧光素和罗丹明，或者荧光素与 Texas Red 的双通道滤波器荧光显微镜观察细胞。

b．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

本产品仅用于科研

UElandy Inc.
Tel:0512-88965152
Web:www. uelandy.com

a. 红色荧光：Ex/Em=550/600 nm；绿色荧光 Ex/Em=485/535 nm。

b. 计算红绿荧光比值。

c. 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。

注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。

2. 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。

3. 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。

4. JC-1 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。

5. JC-1 染色并洗涤完成后尽量在 30 分钟内完成后续检测。在检测前需冰浴保存。

6. 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。

7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于科研

UElandy Inc.
Tel:0512-88965152
Web:www. uelandy.com