

## 线粒体膜电位检测试剂 (JC-1) C0008

**描述:** 线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件。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。分子式: C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>4</sub>IN<sub>4</sub>。JC-1 染料具有单体(monomer form)和聚合物(J-aggregate form)两种形式,以电势依赖性方式积聚在线粒体内。在正常线粒体内,JC-1 聚集在线粒体基质中形成聚合物,聚合物发出强烈的红色荧光 (Ex=585 nm, Em=590 nm); 不健康的线粒体由于膜电位的下降或丧失,JC-1 则以单体形式存在于胞浆中,产生绿色荧光 (Ex=514 nm, Em=529 nm)。通过 JC-1 从红色荧光向绿色荧光的转变可以很容易地检测到细胞膜电位的下降,该转变也作为细胞凋亡早期的一个检测指标。JC-1 不仅可用于定性检测,根据颜色的变化非常直接的反映出线粒体膜电位的变化。也可以用于定量检测,根据红绿荧光强度的比例来衡量线粒体的去极化程度。

**组成:** (100 次, 50 次减半)

JC-1 荧光探针 100ul (1mg/200 ul)

**储存条件:** -20°C 避光保存, 避免反复冻融, 有效期 1 年

**所需设备:** 激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、荧光显微镜、荧光酶标仪等酶标仪

**适用范围:** 检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位

**操作步骤:**

**细胞样本:**

A. 于 6-、12 或 24-孔板上进行细胞铺板, 密度为  $5 \times 10^5$  cells/ml。37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养过夜。选择合适的化合物根据特定的步骤进行凋亡诱导。注: 进行凋亡诱导时, 细胞密度建议不超过  $1 \times 10^6$  cells/ml, 也可根据不同细胞类型培养至合适密度。

B. 用新鲜细胞培养液稀释 JC-1 荧光探针至工作浓度建议 10 µg/ml

1. **JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位 (适用于流式细胞仪)**

**悬浮细胞**

(1) 取 0.5 ml 细胞悬液至无菌离心管内, 用 PBS 洗涤两次, 室温 1000rpm 离心 5 min, 收集细胞。

(2) 取 0.5 ml JC-1 荧光探针工作液重悬细胞, 于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 15-30 min。(注意: 一般情况下 15 min 足以进行充分染色)

(3) 室温 1000rpm 离心 5 min, 收集细胞。

(4) 用 1.5 ml 新鲜细胞培养液重悬细胞, 室温 1000 rpm 离心 5 min, 收集细胞, 重复一次。

(5) 用 0.5 ml 新鲜培养液重悬细胞, 进行后续流式分析。(注意: 请马上进行流式定量分析, 此细节很重要)

(6) 含有红色 JC-1 聚集物的健康细胞线粒体用 FL2 通道检测; 含有绿色 JC-1 单体的凋亡或不健康细胞用 FL1 (FITC) 通道检测。

**贴壁细胞 (建议先收集细胞, 重悬后参考悬浮细胞检测方法)**

## 2. JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位 (适用于荧光显微镜)

### 悬浮细胞

- (1) 样本处理步骤同使用流式细胞仪进行线粒体膜电位检测 (1) ~ (4) 步骤。
- (2) 用 0.3 ml 新鲜细胞培养液重悬细胞, 即可进行荧光显微镜检测。(注意: 请马上进行荧光显微分析)
- (3) **数据分析:** 健康细胞线粒体内, JC-1 聚集形成聚合物, 呈现红色荧光 (最大发射波长为 590 nm)。凋亡或坏死细胞内 JC-1 以单体形式存在, 线粒体呈绿色荧光 (最大发射波长为 530 nm)。然后计算红色荧光信号与绿色荧光信号的比值, 判断细胞健康程度。

### 贴壁细胞

- (1) 培养皿内用盖玻片进行细胞爬片或细胞培养在腔室玻片 (chamber slide) 上。选择合适的化合物根据特定的步骤进行凋亡诱导。(或细胞铺板凋亡诱导处理后, 收集细胞, 参考悬浮细胞处理方法, 检测线粒体膜电位)
- (2) 吸掉培养液, 加入足够覆盖所有细胞的 JC-1 荧光探针工作液 (用新鲜细胞培养液稀释 JC-1 荧光探针至工作浓度建议 10  $\mu\text{g/ml}$ )。于 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱孵育 15-30 min (注意: 一般情况 15 min 足以进行充分染色)。
- (3) 吸掉培养液, 然后用新鲜细胞培养液洗涤细胞 2 次。
- (4) 于荧光显微镜或者共聚焦显微镜下观察。**数据分析同悬浮细胞。**

## 3. JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位 (适用于荧光显微镜)

### 悬浮细胞

- (1) 样本处理步骤同使用流式细胞仪进行线粒体膜电位检测 (1) ~ (4) 步骤。
- (2) 用 0.3 ml 新鲜细胞培养液重悬细胞; 然后按照每孔 100  $\mu\text{l}$  的量将 JC-1 工作液的细胞转移到 96 孔板内 (96 孔板请避光), 即可进行荧光酶标板分析。(注意: 请马上进行荧光显微分析)

### 贴壁细胞

- (1) 培养皿内用盖玻片进行细胞爬片或细胞培养在腔室玻片 (chamber slide) 上。选择合适的化合物根据特定的步骤进行凋亡诱导。(或细胞铺板凋亡诱导处理后, 收集细胞, 参考悬浮细胞处理方法, 检测线粒体膜电位)
- (2) 用 0.3 ml 新鲜细胞培养液重悬细胞; 然后按照每孔 100  $\mu\text{l}$  的量将 JC-1 工作液的细胞转移到 96 孔板内 (96 孔板请避光), 即可进行荧光酶标板分析。(注意: 请马上进行荧光显微分析)

**组织样本:** 可采用单细胞悬液制备仪或传统的组织处理方法如: 酶解法、研磨法等制备单细胞悬液, 然后可参照悬浮细胞操作步骤加入 JC-1 荧光探针进行后续操作。

### 纯化后的线粒体:

- 1、用新鲜细胞培养液稀释 JC-1 荧光探针至工作浓度建议 10  $\mu\text{g/ml}$

- 2、将 0.5ml JC-1 荧光探针工作液加入到,100ul 总蛋白量为 10-100ug 纯化的线粒体中, 于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 10-20 min, 进行荧光分析。

#### 说明:

1. 工作液需用前配制: 将冻存的储存液置于室温充分融化, 用的培养液直接稀释储存液到需要的工作液浓度, 边震荡边稀释, 充分混匀。
2. JC-1 对光敏感, 所有操作步骤的应避免强光。
3. 操作完成后, 应立即进行后续的结果分析, 非常必要。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。