

JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit

——细胞凋亡检测试剂盒

产品货号	包装规格
C037	100 次

储存条件：2~4℃，避光保存。

激发/发射波长：JC-1: 514/529 and 590 nm

产品说明书

晶科德生物科技（武汉）有限公司
Jinkede Biotechnology(Wuhan) Co.,Ltd

武汉市东湖新技术开发区自贸生物创新港 B 区 N1002,N1003(自贸区武汉片区)
N1002,N1003,Zone B,Free Trade Biological Innovation Port,East Lake New Technology
Development Zone,Wuhan(Free Trade Zone,Wuhan Area)

邮编：430000
电话：400-662-6996
网址：www.genecodex-bio.cn

JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit

产品货号: C037

试剂盒组份

组份	试剂名称	包装	浓度	储存条件
组份 A	JC-1	5×100 μ l	100×	-20 $^{\circ}$ C, 避光。
组份 B	CCCP	120 μ l	25 mM in DMSO	-20 $^{\circ}$ C, 避光。

注: 按照推荐的储存条件保存有效期为 1 年。

产品介绍

线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 是一个体现细胞健康水平的线粒体功能性参数。线粒体膜电位在细胞凋亡发生时, 会受到干扰破坏。这种膜电位变化可以通过荧光探针 5, 5', 6, 6' -四氯-1, 1', 3, 3' -四乙基苯酸盐-咪唑羰基花青素(JC-1) 来检测。在健康细胞中, 线粒体膜电位水平高, JC-1 进入细胞后容易在线粒体中富集成为多聚体, 呈现红色荧光。而在凋亡或疾病细胞中, 线粒体膜电位下降, JC-1 以单体形式出现, 发出绿色荧光。利用 JC-1 探针荧光信号的变化来检测凋亡细胞中线粒体膜电位的变化是快速简单有效的检测方法, 可以用于流式结果分析, 荧光显微镜观察和 96 孔荧光酶标板读数。

该检测方法操作简单方便, 只需加 JC-1 探针到细胞培养液中, 孵育 15 分钟, 即可进行荧光显微镜观察或流式细胞仪分析。

实验步骤

流式细胞仪分析

- 1.1 收集细胞, 用 0.5 ml 预热的 PBS 重悬细胞, 并调节细胞密度约为 1×10^6 细胞/ml。
- 1.2 按照实验设计对细胞进行诱导。并设定一组未诱导的细胞作为阴性对照组。在阳性对照组中, 加入 1 μ l 25 mM CCCP (组份 B), 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟。
- 1.3 离心收集细胞, 弃上清, 用 0.5 ml 预热的 PBS 重悬细胞。
- 1.4 往每 0.5 ml 细胞悬液中加入 5 μ l JC-1 探针 (组份 A), 并在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下孵育 15~30 分钟。
- 1.5 离心收集细胞, 弃上清, 用 0.5 ml 预热的 PBS 重悬细胞。重复洗涤一次。
- 1.6 用流式细胞仪分析, 选用 488 nm 激光光源, 滤光片选用 FITC 和罗丹明。

荧光显微镜分析

悬浮细胞

- 2.1 收集细胞，用 0.5 ml 预热的 PBS 重悬细胞，并调节细胞密度约为 1×10^6 细胞/ml。
- 2.2 按照实验设计对细胞进行诱导。并设定一组未诱导的细胞作为阴性对照组。在阳性对照组中，加入 1 μ l 25 mM CCCP (组份 B)，37°C 孵育 10 分钟。
- 2.3 离心收集细胞，弃上清，用 0.5 ml 预热的 PBS 重悬细胞。
- 2.4 往每 0.5 ml 细胞悬液中加入 5 μ l JC-1 探针 (组份 A)，并在 37°C，5% CO₂ 条件下孵育 15~30 分钟。
- 2.5 离心收集细胞，弃上清，用 0.5 ml 预热的 PBS 重悬细胞。重复洗涤一次。
- 2.6 滴一滴细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。用长波段滤光片在荧光显微镜同时观察绿色和红色荧光信号。

贴壁细胞

- 3.1 直接用盖玻片来培养细胞。
- 3.2 按照实验设计对细胞进行诱导。并设定一组未诱导的细胞作为阴性对照组。在阳性对照组中，加入 1 μ l 25 mM CCCP (组份 B)，37°C 孵育 10 分钟。
- 3.3 用 PBS 洗涤细胞两次。
- 3.4 准备 1 \times JC-1 工作液。使用预热的 PBS 按照 1:100 比例稀释 100 \times JC-1 溶液 (组份 A)。每个细胞样本中加入 0.5 ml 1 \times JC-1 工作液，37°C，5% CO₂ 条件下孵育 15~30 分钟。
- 3.5 用 PBS 洗涤细胞两次。
- 3.6 将盖玻片倒置于载玻片上，用长波段滤光片在荧光显微镜同时观察绿色和红色荧光信号。

荧光酶标仪分析

悬浮细胞

- 4.1 收集细胞，用 0.5 ml 预热的 PBS 重悬细胞，并调节细胞密度约为 1×10^6 细胞/ml。
- 4.2 按照实验设计对细胞进行诱导。并设定一组未诱导的细胞作为阴性对照组。在阳性对照组中，加入 1 μ l 25 mM CCCP (组份 B)，37°C 孵育 10 分钟。
- 4.3 离心收集细胞，弃上清，用 0.5 ml 预热的 PBS 重悬细胞。
- 4.4 往每 0.5 ml 细胞悬液中加入 5 μ l JC-1 探针 (组份 A)，并在 37°C，5% CO₂ 条件下孵育 15~30 分钟。

- 4.5 离心收集细胞，弃上清，用 0.6 ml 预热的 PBS 重悬细胞。重复洗涤一次。
- 4.6 往黑色的 96 孔板中每孔加入 200 μ l 细胞悬液。
- 4.7 用荧光酶标仪分别检测绿色和红色荧光信号。绿色荧光信号采用激发/发射波长为 485/535 nm；红色荧光信号采用激发/发射波长为 485/535 nm。
- 4.8 计算红色荧光信号与绿色荧光信号的比值。

贴壁细胞

- 5.1 接种到黑色的 96 孔板，并培养至正常生长状态。
- 5.2 按照实验设计对细胞进行诱导。并设定一组未诱导的细胞作为阴性对照组。在阳性对照组中，加入 1 μ l 25 mM CCCP (组份 B)，37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟。
- 5.3 用 PBS 洗涤细胞一次。
- 5.4 准备 1 \times JC-1 工作液。使用预热的 PBS 按照 1:100 比例稀释 100 \times JC-1 溶液 (组份 A)。每孔加入 200 μ l 1 \times JC-1 工作液，37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 条件下孵育 15~30 分钟。
- 5.5 用 PBS 洗涤细胞两次。每孔加入 200 μ l PBS。
- 5.6 用荧光酶标仪分别检测绿色和红色荧光信号。绿色荧光信号采用激发/发射波长为 485/535 nm；红色荧光信号采用激发/发射波长为 550/600 nm。
- 5.7 计算红色荧光信号与绿色荧光信号的比值。

实验案例

使用 10 μ M 喜树碱处理 Jurkat 细胞 4 小时作为阳性实验组，同时设置未处理组做阴性对照。使用 JC-1 探针对以上两组细胞按实验操作说明进行处理，流式细胞仪进行分析。结果显示，阳性实验组（右图）相比对照组（左图），获得更高的凋亡细胞数量。

