

产品组成:

规格	20 assays	50 assays	100 assays
JC-1	100ul	250ul	500ul
10×孵育缓冲液	4ml	10ml	20ml

储存条件:

JC-1 -20℃避光保存, 避免反复冻融。

孵育缓冲液 2-8℃保存。

有效期: 一年。

产品简介:

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(mitochondrial membrane potential) $\Delta\Psi_m$ 的理想荧光探针。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, 488nm 激发时的最大发射波长为 590nm, 可以产生红色荧光, 在流式图上表现为 FL1 和 FL2 双阳性; 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, 488nm 激发时最大发射波长为 527nm, 可以产生绿色荧光, 形成流式图中所有细胞 FL1 均为阳性。凋亡细胞则大多为 FL1 单阳性。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。常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。

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细胞膜电位的下降, 同时也可以利用 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。

使用方法:

➤ 悬浮细胞

1、孵育缓冲液和 JC-1 染色工作液的配制: 根据样品数按下列比例配制孵育缓冲液和 JC-1 染色工作液。取 100ul 10×孵育缓冲液加 900ul 无菌纯水稀释, 混匀并预热至 37℃, 即成 1×孵育缓冲液; 在 500ul 1×孵育缓冲液中加入 5ul JC-1, 涡旋混匀配成 JC-1 染色工作液;

2、收集样本细胞以及阴性、阳性对照细胞。细胞数量在 $2-5 \times 10^5$ 个。

3、用 PBS 洗涤细胞两次。离心收集细胞。

4、用 500ul JC-1 染色工作液将细胞重悬, 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中孵育 15 分钟。

5、常温离心收集细胞。

6、用 500ul 预热的孵育缓冲液将细胞重悬。

7、用流式细胞仪或荧光分光光度计检测分析结果, 或者用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察结果。

➤ 贴壁细胞

对于贴壁细胞, 可以先收集细胞, 重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

➤ 纯化线粒体

1、把配制好的 JC-1 染色工作液再用 JC-1 孵育缓冲液 (1×) 稀释 5 倍。

2、0.9mL 5 倍稀释的 JC-1 染色工作液中加入 0.1mL 总蛋白量为 10~100ug 的纯化的线粒体。

3、结果检测。

➤ 组织样本

组织样本可以用玻璃匀浆器匀浆成单细胞悬液后按照细胞样本的方法检测。也可以用其他细胞悬液制备的试剂盒处理组织后检测。

结果分析：

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。

用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况，绿色荧光通过 FL1 通道检测；红色荧光通过 FL2 通道检测。FL-1+,FL-2+ 为正常细胞，FL-1+,FL-2- 为凋亡细胞。

用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察：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 PI 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。

用荧光分光光度计或荧光酶标仪检测：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。