Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit(with JC-1)

Cat. No: E-CK-A301 **Size: 20 Assays/50 Assays/100 Assays**

产品编号	产品名称	20 Assays	50 Assays	100 Assays	Storage
E-CK-A301A	JC-1 (500×)	20 μL	50 μL	100 μL	-20°C, shading light
E-CK-A301B	JC-1 Assay Buffer (10×)	4 mL	10 mL	10 mL×2	2-8°C
E-CK-A301C	10 mM CCCP	40 μL	40 μL	40 μL	-20°C, shading light
	说明书			一份	

保存条件

JC-1 Assay Buffer (10×)请 2-8°C 保存，其余试剂保存于-20°C。保质期一年。

JC-1 (500×)和 10 mM CCCP 需避光保存，避免反复冻融。

产品简介

Elabscience® Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit(with JC-1)以 JC-1 为荧光探针，通过快速检测线粒体膜电位变化从而检测细胞早期凋亡的试剂盒。本试剂盒提供羰基氰化物间氯苯腙（CCCP）[E-CK-A301C]作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照试剂。

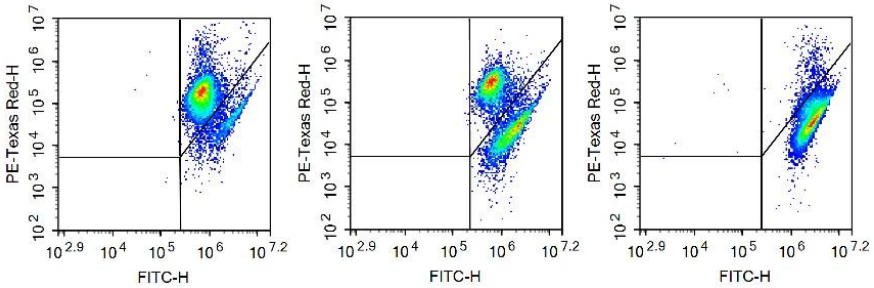
检测原理

线粒体膜电位下降是细胞凋亡早期的标志性事件，发生在细胞核凋亡特征（染色质浓缩、DNA 断裂）出现之前，一旦线粒体膜电位崩溃，细胞凋亡便不可逆转。

JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位ΔΨm 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。JC-1 有单体和多聚体两种存在形式，两者发射光谱不同。在正常细胞内，线粒体膜电位较高，JC-1 以多聚体形式存在于线粒体的基质中，产生红色荧光；凋亡早期，线粒体膜电位降低，JC-1 以单体形式存在于线粒体基质中，产生绿色荧光。

通过 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变可反映细胞膜电位的下降，可将 JC-1 荧光颜色的转变作为细胞凋亡早期的检测指标。常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。

JC-1 单体的最大激发波长为 514 nm，最大发射波长为 529 nm；JC-1 多聚体的最大激发波长为 585 nm，最大发射波长为 590 nm。实际观察时，常规设置红色荧光和绿色荧光即可。



本试剂盒检测喜树碱诱导的 Jurkat 细胞凋亡效果如图所示：正常细胞（左）存在少量凋亡，表现为出现少量线粒体膜电位崩塌细胞；诱导凋亡细胞（中, 2.5 μM 喜树碱处理 Jurkat 细胞 24 h）出现大量线粒体膜电位崩塌细胞；CCCP 处理细胞（右，阳性对照）几乎所有细胞线粒体膜电位崩塌。

自备试剂及仪器

超纯水、荧光显微镜/激光共聚焦显微镜、流式细胞仪。

试剂配制

1. JC-1 工作液配制

按照每 20 μL JC-1 (500×)加入 9 mL 超纯水（自备）的比例稀释 JC-1，涡旋混匀，再加入 1 mL JC- 1 Assay Buffer (10×)，混匀后即为 JC-1 工作液。

注：

a) JC-1 工作液需现配现用。

b) 对于细胞悬液，每 5×10^5~1×10^6 个细胞所需 JC-1 工作液的量为 0.5 mL。

c) 因 JC-1 在水中的溶解度较小，为促进溶解可 37℃加热。

2. 1× JC-1 Assay Buffer 的配制

用超纯水将 JC-1 Assay Buffer (10×)稀释 10 倍，配置好的 1×JC-1 Assay Buffer 密封保存于 2-8°C，一周内使用完毕。

实验操作指南

➢ **预备步骤**

设置阳性对照（仅阳性对照样本需要此步骤）：用细胞培养液将 10 mM CCCP 稀释 1000 倍，使 CCCP 终浓度为 10 μM，按照用 10 μM CCCP 孵育细胞 20 min。

注：对大多数细胞，用 10 μM 的 CCCP 处理 20 min，线粒体膜电位会完全丧失，JC-1 染色后呈绿色荧光，而正常的细胞经 JC-1 染色后呈红色荧光。对于特定的细胞，CCCP 的作用浓度和时间可能有所不同，请参考相关文献。

➢ **悬浮细胞实验步骤**

1. 收集细胞悬液并进行细胞计数，取 5×10^5~1×10^6 个细胞，300×g 离心 5 min，弃上清。
2. 用 500 μL JC-1 工作液重悬细胞，37°C 孵育 20 min。

注：孵育温度与细胞类型有关，一般哺乳动物细胞为 37°C，其他种属根据细胞培养条件选择合适的温度。

3. 孵育结束后，300×g 离心 5 min，弃上清，用 1×JC- 1 Assay Buffer 洗细胞 1 次（300×g，5 min），弃上清。
4. 用适量 1×JC-1 Assay Buffer 重悬细胞，优先用流式细胞仪进行分析，也可以用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜进行观察。

注：

a) 为防止荧光淬灭，请尽快（30 min 内）进行检测/观察，检测前请 4°C 避光保存。

b) 荧光显微镜观察结果时，为避免荧光淬灭过快，建议先将白光光源和荧光功率尽量调低，然后调节适宜的曝光时间进行观察/拍照。

c) 若荧光显微镜滤光片为长通滤光片，可以在绿色荧光通道同时检测正常细胞和膜电位降低细胞。

➢ **贴壁细胞实验步骤**

1. 吸弃贴壁细胞的培养上清，用 1×JC-1 Assay Buffer（使用前需提前在 37°C 复温，避免温度过低导致细胞性能改变）清洗细胞一次。
2. 按照下表加入适量的 JC-1 工作液，37°C 孵育 20 min。

细胞培养器皿	JC-1 工作液加样体积
96 孔板	100 μL/孔
24 孔板	300~500 μL/孔
12 孔板	0.5~1 mL/孔
6 孔板	1 mL/孔

注：

a) 孵育温度与细胞类型有关，一般哺乳动物细胞为 37°C，其他种属根据细胞培养条件选择合适的温度。

b) 对于贴壁能力弱的细胞，建议先做防脱处理后再进行细胞的接种和染色，或者用基础培养基直接将 JC-1 (500×)稀释成 1×来配制 JC-1 工作液。

3. 孵育结束后，用 1×JC-1 Assay Buffer 清洗细胞一次，然后加入 2 mL 细胞培养液或 1×JC-1 Assay Buffer。
4. 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察结果。

注：

a) 为防止荧光淬灭，请尽快（30 min 内）进行检测/观察，检测前请 4°C 避光保存。

b) 荧光显微镜观察结果时，为避免荧光淬灭过快，建议先将白光光源和荧光功率尽量调低，然后调节适宜的曝光时间进行观察/拍照。

c) 若荧光显微镜滤光片为长通滤光片，可以在绿色荧光通道同时检测正常细胞和膜电位降低细胞。

5. 对于贴壁细胞用流式细胞仪检测的情况，可以先收集细胞，然后参考上述细胞悬液实验步骤进行检测。须注意的是，良好的细胞状态是实验的关键。贴壁生长的细胞用于凋亡检测时，可能会因为胰酶消化、吹打等机械操作造成细胞坏死或凋亡，从而影响实验结果。

注意事项

1. 本产品仅用于科研，不得用于临床诊断。
2. 为了您的安全和健康，请遵守实验室试剂操作规范操作。CCCP 为线粒体电子传递链抑制剂，对人体有害，操作时请穿实验服并戴一次性手套，避免直接接触人体或吸入体内。
3. 本试剂盒有效期为 1 年，为获得最佳使用效果，建议在 6 个月内使用。
4. JC-1 在较低温度情况下会有凝固或沉淀，可在 20-25°C 水浴至全部溶解后使用。
5. 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光。
6. 离心机升速和降速过高会引起细胞的损失，为保证细胞的得率和状态，建议离心时调整离心机升速不大于 3，降速不大于 2，即 Acc≦3，Dec≦2。