上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

JC-1 溶液(2mmol/L)

简介：

JC-1 是一种检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential)的理想荧光探针，在线粒体膜电位较高时 JC-1 聚集在线粒体的基质(matrix)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，产生绿色荧光，这样就可以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。线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件，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，这种转变也可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 514nm，最大发射波长为 529nm，JC-1 聚合物(J-aggregates)的最大激发波长为 585nm，最大发射波长为 590nm，实际观察时使用常规的观察红色荧光和绿色荧光的装置即可。

JC-1 溶液(2mmol/L) 是线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1 法)的重要组成成分，工作浓度为 5～10umol/L。该试剂仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

组成：

编号 / 名称	R30081	Storage
JC-1 溶液(2mmol/L)	2×100μl	-20℃ 避光
说明书	一份	

自备材料：

1、磷酸盐缓冲液或 PBS

2、CCCP 溶液

3、细胞培养液

4、荧光显微镜

操作步骤(仅供参考)：

1、配制 JC-1 染色工作液：

取适量 JC-1 溶液(2mmol/L)，按照每 50μl JC-1 溶液(2mmol/L)加入 10ml PBS 或细胞培养液的比例稀释 JC-1，剧烈 Vortex 充分混匀，即为 JC-1 染色工作液，6 孔板每孔所需 JC-1 染色工作液的量为 1ml，其它培养器皿的 JC-1 染色工作液的用量以此类推； 对于细胞悬液每 0.5～1.0×10^6 细胞需 0.5ml JC-1 染色工作液。

2、设置阳性对照：

推荐 CCCP(10mM)按照 1:1000 的比例加入到细胞培养液中，稀释至 10μM，处理细胞 20min，随后按照下述方法装载 JC-1，进行线粒体膜电位的检测；对于大多数细胞，通常 10μM CCCP 处理 20min 后线粒体的膜电位会完全丧失，JC-1 染色后观察应呈绿色荧光；而正常的细胞经 JC-1 染色后应显示红色荧光；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。

3、对于悬浮细胞：

a. 取 1～6×10^5 细胞，重悬于 0.5ml 细胞培养液中，细胞培养液中可以含血清和酚红。

b. 加入 0.5ml JC-1 染色工作液，颠倒数次混匀，细胞培养箱中 37℃孵育 20min。

c. 37℃孵育结束后，4℃ 600g 离心 3～4min，沉淀细胞，弃上清。

d. 用 PBS 洗涤 2 次：加入 1ml PBS 重悬细胞，4℃ 600g 离心 3～4min，沉淀细胞，弃上清，重复一次。

e. 再用少量 PBS 重悬后，用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察，也可以用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

4、对于贴壁细胞：

注意：对于贴壁细胞，如果希望采用荧光分光光度计或流式细胞仪检测，

应先收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

a. 吸除 6 孔板培养液，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。

b. 加入 1ml JC-1 染色工作液，充分混匀，细胞培养箱中 37℃孵育 20min。

c. 37℃孵育结束后，吸除上清，用 PBS 洗涤 2 次。

d. 加入 2ml 细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。

e. 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

5、对于纯化的线粒体：

a. 把配制好的 JC-1 染色工作液再稀释 5 倍。

b. 0.9ml JC-1 染色工作液中加入 0.1ml 总蛋白量为 10～100μg 纯化的线粒体。

c. 用荧光分光光度计或荧光酶标仪检测：混匀后直接用荧光分光光度计进行时间扫描，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，另外也可以参考下面步骤 6 中的波长设置进行荧光检测。

d. 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察：方法同下面的步骤 6。

6、荧光观测和结果分析：

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。注意：此处测定荧光时不必把激发光和发射光设置在最大激发波长和最大发射波长，如使用荧光显微镜观察，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，如碘化丙啶或 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。

注意事项：

1、JC-1 溶液应避免反复冻融。

2、装载完 JC-1 后用 PBS 洗涤时，尽量使 PBS 保持 4℃左右，洗涤效果较好。

3、JC-1 探针装载完并洗涤后尽量在 30min 内完成后续检测，在检测前需冰浴保存。

4、CCCP 为线粒体电子传递链抑制剂，有一定毒性，请注意小心防护。

有效期： 12 个月有效。