



线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）说明书

货号：WGD-X-3100145

一 产品介绍

线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）是一种以 JC-1 为荧光探针，用于快速、灵敏地检测细胞、组织或纯化后的线粒体膜电位变化，是筛选早期凋亡细胞的常用方法。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，其以电势依赖性的方式积聚在线粒体内。在线粒体膜电位较高时，JC-1 以聚合物的形式聚集在线粒体基质中，发出红色荧光（Ex=585 nm, Em=590 nm）；在线粒体膜电位较低时，JC-1 只能以单体的形式存在于胞浆中，产生绿色荧光（Ex=514 nm, Em=529 nm）。因此，通过分析红/绿荧光强度的比值可以检测线粒体膜电位的变化趋势。本试剂盒可用于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。

本试剂盒内含 CCCP，以作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。对于六孔板中的样品，本试剂盒共可以检测 100 个样品；对于 12 孔板中的样品，本试剂盒共可以检测 200 个样品。

二 产品目录

产品名称	规格
线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）	100 rxns

三 产品组成

组分	100 rxns
JC-1（200×）	100 μL×5
JC-1 染色缓冲液（5×）	80 mL
CCCP（50 mM）	20 μL
超纯水	90 mL

四 产品用途

本产品适用于检测线粒体膜电位变化以及细胞早期凋亡等。

五 产品特点

- 操作简便：无需额外配制其他试剂。
- 特异性强：染色效果好、背景干净。
- 细胞毒性低：无明显细胞毒性，染色后仍可继续培养。

六 注意事项

- JC-1（200×）在 4℃、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可以 20～25℃水浴至全部融解并混匀后再使用。
- 必须先将 JC-1（200×）用试剂盒提供的超纯水充分溶解混匀后，再加入 JC-1 染色缓冲液（5×）。不可先配制 JC-1 染色缓冲液（1×）再加入 JC-1（200×）。
- 装载完 JC-1 后用 JC-1 染色缓冲液（1×）洗涤时，使 JC-1 染色缓冲液（1×）保持 4℃左右，此时的洗涤效果较好。
- JC-1 探针装载完并洗涤后尽量在 30 分钟内完成荧光检测。
- 勿将 JC-1 染色缓冲液（5×）全部配制成 JC-1 染色缓冲液（1×），在本试剂盒的使用过程中，配制 JC-1 染色工作液以及后续洗涤均需直接使用 JC-1 染色缓冲液（5×）。
- 如果发现 JC-1 染色缓冲液（5×）中有沉淀，必须全部溶解后才能使用，为促进溶解可以在 37℃加热。

7. CCCP 为线粒体电子传递链抑制剂，对人体有害，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。

8. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

I 操作步骤

1. JC-1 染色工作液的配制

取适量 JC-1 (200×)，按照每 50 μL JC-1 (200×) 加入 8 mL 超纯水的比例稀释 JC-1 (200×)，剧烈振荡溶解，再加入 2 mL JC-1 染色缓冲液 (5×)，混匀后即为 JC-1 染色工作液。

2. 阳性对照的设置

将试剂盒中提供的 CCCP (50 mM) 瞬离后按照 1:1000 的比例加入到细胞培养液中，稀释至 50 μM，处理细胞 20 分钟。随后按照下述方法装载 JC-1，进行线粒体膜电位的检测。

注意：对于大多数细胞，通常 50 μM CCCP 处理 20 分钟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 染色后观察呈红色荧光。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决定或优化体系摸索最优条件。

3. 对于悬浮细胞

- 取 10~50 万细胞收集沉淀，加入 0.5 mL 细胞培养液重悬（细胞培养液中可以含血清和酚红）。
- 加入 0.5 mL JC-1 染色工作液，颠倒数次混匀，于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱孵育 20 分钟。
- 孵育期间，按照每 1 mL JC-1 染色缓冲液 (5×) 加入 4 mL 蒸馏水的比例，配制适量的 JC-1 染色缓冲液 (1×)，冰浴预冷。
- 37℃孵育结束后，600 g 4℃离心 3~4 分钟，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸到细胞。
- 加入 1 mL JC-1 染色缓冲液 (1×) 重悬细胞，600 g 4℃离心 3~4 分钟，沉淀细胞，弃上清。
- 重复上一步骤。
- 再取适量 JC-1 染色缓冲液 (1×) 重悬细胞，使用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜进行观察，也可使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

- 对于六孔板培养的贴壁细胞，吸除培养液后，可用 PBS 或其它适当溶液洗涤细胞一次，加入 1 mL 细胞培养液（细胞培养液中可以含有血清和酚红）。
- 加入 1 mL JC-1 染色工作液，充分混匀，于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱孵育 20 分钟。
- 在孵育期间，按照每 1 mL JC-1 染色缓冲液 (5×) 加入 4 mL 蒸馏水的比例，配制适量的 JC-1 染色缓冲液 (1×)，冰浴预冷。
- 37℃孵育结束后，弃上清，用 JC-1 染色缓冲液 (1×) 洗涤 2 次。
- 加入 2 mL 细胞培养液（培养液中可以含有血清和酚红），使用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜进行观察。

注意：如果采用荧光分光光度计或流式细胞仪检测，可先收集细胞沉淀，参考上述悬浮细胞的检测方法进行检测。

5. 对于纯化的线粒体

- 按照每 1 mL JC-1 染色工作液加入 4 mL JC-1 染色缓冲液 (1×) 的比例，配制稀释 5 倍的 JC-1 染色工作液，混匀备用。
- 取 0.9 mL 稀释 5 倍的 JC-1 染色工作液，加入 0.1 mL 总蛋白量为 10~100 μg 纯化的线粒体混匀。
- 使用荧光分光光度计或荧光酶标仪检测：设置激发波长为 485 nm，发射波长为 590 nm，进行时间扫描。如果使用荧光酶标仪，激发波长不能设置为 485 nm 时，可以在 475~520 nm 范围内设置激发波长。另外，也可以参考步骤 6 中的波长设置进行荧光检测。
- 使用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜进行观察。

6. 荧光观测和结果分析



检测 JC-1 单体时，可将激发光设置为 490 nm，发射光设置为 530 nm；

检测 JC-1 聚合物时，可将激发光设置为 525 nm，发射光设置为 590 nm。

注意：（1）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 聚合物时可使用常来检测碘化丙啶或者 Cy3 用的标准带通滤波器。检测 JC-1 单体可使用常来检测绿色荧光化合物如 FITC 的标准带通滤波器。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。

（2）也可使用双带带通滤波器如 FITC/罗丹明， FITC/Texas Red 来同时检测两种荧光探针。

（3）由于红色的 JC-1 信号淬灭比绿色快，所以使用标准带通滤波器检测时应先检测红色荧光并拍照。

■ 储存及运输条件

-25 ~ -15℃避光保存 12 个月，尽量避免反复冻融。超纯水和 JC-1 染色缓冲液（5×）可置于 2 ~ 8℃保存。冰袋运输。

■ 常见问题及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
JC-1 溶解不充分	JC-1（200×）稀释前未完全融解	37℃解冻，待其完全融解后再吸取 JC-1（200×）进行稀释。
	JC-1（200×）的稀释步骤错误	先将 JC-1（200×）用试剂盒提供的超纯水充分溶解混匀后，再加入 JC-1 染色缓冲液（5×）。
	JC-1 浓度过高	使用 JC-1 染色缓冲液（1×）适当增加稀释倍数
荧光弱	孵育时间过短	适当延长孵育时间。
	曝光时间过短	延长曝光时间。
荧光过强	孵育时间过长	适当降低孵育时间。
	曝光时间过长	缩短曝光时间。
背景高	JC-1 或 CCCP 浓度过高	降低 JC-1 或 CCCP 的浓度；调整曝光时间。
	洗涤不充分	增加洗涤次数与时间。
CCCP 处理后细胞仍存在未凋亡情况	处理细胞的 CCCP 浓度和时间不够	提高 CCCP 浓度或延长 CCCP 孵育时间。