

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)

Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (JC-1)

产品描述

TargetMol 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 是一种以 JC-1 为荧光探针，专用于快速检测线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 动态变化的试剂盒。线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 指线粒体内膜两侧的电位差，其形成与维持对线粒体的能量代谢、物质运输及细胞生存至关重要，是反映线粒体功能的重要指标。

JC-1 是一种常用于线粒体膜电位检测的亲脂性阳离子荧光探针，全称为 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑羰花菁碘化物。JC-1 可自由穿透细胞膜，它在不同的线粒体膜电位条件下聚集状态会发生变化，其检测线粒体膜电位的原理为：线粒体膜电位较高时，JC-1 通过跨膜电位驱动进入线粒体基质，因基质内高浓度环境形成聚集体 (J-aggregates)。此时，JC-1 分子间相互作用改变荧光特性，被激发后发红色荧光 (最大激发波长 585 nm，最大发射波长 590 nm)。当线粒体膜电位降低时 (如细胞凋亡早期)，JC-1 无法在基质中聚集，以单体形式存在，被激发后发绿色荧光 (最大激发波长 514 nm，最大发射波长 529 nm)。通过检测细胞内红/绿荧光的相对强度比值，可衡量线粒体膜电位的变化，进而反映细胞的凋亡状态等。

本试剂盒适用范围广泛，兼容细胞、组织及纯化线粒体等多种样本类型，并且能适配荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光分光光度计及流式细胞仪等多种检测仪器。

产品信息

| 产品编号 | 产品名称 | 浓度 | 溶剂 | 规格 |
|---------|------|-------------------|------|----------------------------|
| C0174-1 | JC-1 | 400 μM | DMSO | 100 $\mu\text{L} \times 5$ |
| C0174-2 | CCCP | 10 mM | DMSO | 100 μL |

产品特点

1. 灵敏度高。
2. 对照体系完善。
3. 细胞毒性低。
4. 探针稳定性好。
5. 兼容性好，可与多重荧光探针共染 (如 Annexin V-FITC 等)。

产品应用

凋亡早期线粒体膜电位检测、线粒体靶向药物开发、线粒体功能与代谢疾病研究、衰老细胞线粒体功能衰退研究。

工作液配制

用适宜稀释液 (无血清培养基或 PBS) 将储备液稀释成浓度为 2 μM 的工作液。

本试剂盒若用于 6 孔板，工作液浓度为 2 μM ，每孔检测体积为 1 mL，则可检测 100 次；若用于 96 孔板，工作液浓度为 2 μM ，每孔检测体积为 100 μL ，则可检测 1000 次。

使用说明

1. 对照组设置：

(1) 阳性对照组（CCCP 组）：CCCP 是一种常用的解偶联剂，其作为质子载体可携带质子穿过线粒体内膜，消除膜两侧的质子浓度差，线粒体膜电位依赖于质子梯度的维持，CCCP 的作用会导致线粒体膜电位迅速下降。CCCP 能诱导线粒体膜电位丧失，在线粒体膜电位检测实验中常被用作阳性对照。

具体步骤为：用无血清培养基将 CCCP 储备液（10 mM）稀释成浓度为 10 μ M 的 CCCP 工作液。吸除旧培养基，向细胞加入 CCCP 工作液，处理 20-30 min。然后按下述对悬浮细胞或贴壁细胞进行 JC-1 染色的步骤，加入适量 JC-1 工作液，进行线粒体膜电位检测。10 μ M CCCP 处理 20-30 min 几乎能诱导大多数细胞的线粒体膜电位丧失，经 JC-1 染色后观察到绿色荧光；线粒体膜电位正常的细胞经 JC-1 染色后可观察到红色荧光。

(2) 阴性对照组（溶剂对照组）：不进行药物处理或其他干预，排除药物本身或实验操作导致的非特异性荧光干扰。

(3) 空白对照组：细胞不用药物处理，也不经 JC-1 染色，用于检测自发荧光或背景信号。

2. 对于悬浮细胞：

(1) 将细胞悬液以 600 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 4 min，弃上清。加入 PBS 重悬细胞，以 600 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 4 min，弃上清，收集细胞沉淀。

(2) 加入适量 JC-1 染色工作液重悬细胞，调整细胞密度为 5×10^5 - 1×10^6 cells/mL，将细胞转移至 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中避光孵育 20 min。

(3) 孵育结束后，以 600 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 4 min，弃上清。

(4) 加 PBS 重悬细胞，以 600 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 4 min，弃上清。重复此步骤 1 次。

(5) 加入适量 PBS 重悬细胞，在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察染色情况，也可以用流式细胞仪或荧光分光光度计检测染色结果。

3. 对于贴壁细胞：

(1) 吸除培养液，加入 PBS 洗涤细胞 1 次。

(2) 加入适量 JC-1 染色工作液，将细胞转移至 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中避光孵育 20 min。

(3) 孵育结束后，吸除染色液，用 PBS 洗涤 2 次。

(4) 加入适量 PBS 覆盖住细胞，在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

注：若需要用流式细胞仪或荧光分光光度计检测贴壁细胞，可先用胰蛋白酶对贴壁细胞进行消化，收集、重悬细胞后参照上述悬浮细胞的操作步骤进行线粒体膜电位检测。

4. 结果检测：

检测荧光时不必把激发光和发射光设置在最大激发/发射波长处，检测绿色荧光时可以设置激发光波长为 490 nm，发射光波长为 530 nm；检测红色荧光时，可以设置激发光波长为 525 nm，发射光波长为 590 nm。

储存条件

-20 $^{\circ}$ C 避光保存，一年有效。

注意事项

1. 由于样本类型和实验环境的不同均会影响染色效率，建议通过预实验来优化 JC-1 工作液浓度和染色时间。
2. CCCP 的最佳工作浓度和处理时间也可能因为样本不同而有差异，可通过预实验调整最佳条件，建议工作浓度范围是 1-20 μ M。
3. JC-1 荧光探针适用于活细胞的线粒体膜电位检测，而不适用于固定细胞或固定组织的线粒体膜电位检测。
4. JC-1 属于荧光染料，光照易导致荧光淬灭，操作过程应注意避光。
5. 本品仅适用于专业科研用途，严禁用于临床诊断、治疗、食品或药品领域，且不得存放于住宅等非专业场所。
6. 为保障操作安全与人员健康，操作时请务必穿戴实验服并佩戴一次性手套。

