

线粒体膜电位检测试剂盒(JC-10)

JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

产品信息

产品名称	编号	规格
线粒体膜电位检测试剂盒(JC-10)	DY80206	100T

产品描述

线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-10) 是一种以 JC-10 为荧光探针, 快速灵敏地检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位变化的试剂盒, 可以用于早期的细胞凋亡检测。正常线粒体内, 线粒体膜电位较高, JC-10 聚集在线粒体基质中形成聚合物, 聚合物发出强烈的红色荧光 (Ex=540nm, Em=590 nm); 不健康的线粒体由于膜电位的下降或丧失, JC-10 只能以单体的形式存在于胞浆中, 产生绿色荧光 (Ex=490 nm, Em=525 nm)。JC-10 不仅可用于定性检测, 因颜色的变化可以非常直接的反映出线粒体膜电位的变化。也可以用于定量检测, 因线粒体的去极化程度可以通过红/绿荧光强度的比例来衡量。观察时, 只需使用常规的观察红色荧光和绿色荧光的设置即可。本试剂盒提供了 CCCP 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 孔中的样品, 本试剂盒共可以检测 200 个样品。。

保存方式

-20°C避光保存, 尽量避免反复冻融, 有效期一年。超纯水和 JC-10 染色缓冲液 (5×) 也可 4°C保存。

试剂盒组份

试剂名称	规格
JC-10(200×)	100μL/管, 共 5 管
超纯水	90mL
JC-10 染色缓冲液(5×)	80mL
CCCP(10mM)	20μL

操作说明

1. JC-10 染色工作液的配制

6 孔板每孔所需 JC-10 染色工作液的量为 1mL, 其他培养器皿的 JC-10 染色工作液的用量以此类推: 对于细胞悬液每 50 ~ 100 万细胞需 0.5mL JC-10 染色工作液。取适量 JC-10 (200×), 按照每 50μL JC-10 (200×) 加入 8mL 超纯水的比例稀释 JC-10。剧烈震荡充分溶解并混匀 JC-10。然后再加入 2mL JC-10 染色缓冲液 (5×), 混匀后即成为 JC-10 染色工作液。

2. 阳性对照的设置

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

3. 对于悬浮细胞

取10~60万细胞，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。加入0.5mL JC-10染色工作液，颠倒数次混匀。细胞培养箱中37°C孵育20分钟。在孵育期间，按照每1mL JC-10染色缓冲液(5×)加入4mL蒸馏水的比例，配制适量的JC-10染色缓冲液(1×)，并放置于冰浴。37°C孵育结束后，600g 4°C离心3~4分钟，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。用JC-10染色缓冲液(1×)洗涤2次：加入1mL JC-10染色缓冲液(1×)重悬细胞，600g 4°C离心3~4分钟，沉淀细胞，弃上清。再加入1mL JC-10染色缓冲液(1×)重悬细胞，600g 4°C离心3~4分钟，沉淀细胞，弃上清。再用适量JC-10染色缓冲液(1×)重悬后，用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察，也可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，可以先收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

对于六孔板的一个孔，吸除培养液，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。加入1mL JC-10染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中37°C孵育20分钟。在孵育期间，按照每1mL JC-10染色缓冲液(5×)加入4mL蒸馏水的比例，配制适量的JC-10染色缓冲液(1×)，并放置于冰浴。37°C孵育结束后，吸除上清，用JC-10染色缓冲液(1×)洗涤2次。加入2mL细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。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

把配制好的JC-10染色工作液再用JC-10染色缓冲液(1×)稀释5倍。0.9mL 5倍稀释的JC-10染色工作液中加入0.1mL总蛋白量为10~100μg纯化的线粒体。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(time scan)，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。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-10单体时可以把激发光设置为490nm，发射光设置为530nm；检测JC-10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-10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-10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，细胞的状态也正常。

注意事项：

1. JC-10(200×)在4°C或冰浴等较低温度下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可以20~25°C水浴片刻至全部融解后使用。
2. 必须先把JC-10(200×)用试剂盒提供的超纯水充分溶解混匀后，才可以加入JC-10染色缓冲液(5×)。不可先配制JC-10染色缓冲液(1×)再加入JC-10(200×)，这样JC-10会很难充分溶解，会严重影响后续的检测。
3. 装载完JC-10后用JC-10染色缓冲液(1×)洗涤时，使JC-10染色缓冲液(1×)保持4°C左右，此时的洗涤效果较好。
4. JC-10探针装载完并洗涤后尽量在30分钟内完成后续检测。在检测前需冰浴保存。
5. 请勿把JC-10染色缓冲液5×全部配制成JC-10染色缓冲液1×，本试剂盒使用过程中需直接使用JC-10染色缓冲液5×。
6. 如果发现JC-10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°C加热。
7. CCCP为线粒体电子传递链抑制剂，有毒，请注意小心防护。

本产品仅作科研用途