线粒体膜电位检测试剂盒(JC-10)

产品编号：MA1748　　规格：100T

产品内容

产品组成	MA1748-1
JC-10(200×)	100μL/管，共5管
超纯水	90mL
JC-10染色缓冲液(5×)	80mL
CCCP(10mM)	50μL
说明书	1 份

产品简介

线粒体膜电位检测试剂盒(JC-10) 即Mitochondrial membrane potential assay kit with JC-10，是以JC-10 作为荧光探针来快速检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位变化的试剂盒，可用于高灵敏的检测细胞凋亡早期的发生。

JC-10 是一种广泛用于检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential)△Ψm 的理想荧光探针。线粒体膜电位的丧失被认为是细胞凋亡的早期事件。线粒体对 JC-10 的摄取可作为凋亡细胞和正常细胞的有效区分指标。线粒体膜电位较高时，JC-10 以聚合物 (J-aggregates) 形式存在于线粒体基质中，产生红色荧光；线粒体膜电位较低时，JC-10 不能聚集在线粒体中，而是以单体 (monomer) 形式弥散在整个细胞中，产生绿色荧光。因此荧光颜色的转变反映了线粒体膜电位的变化。通常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。

JC-10 单体的最大激发波长为490nm，最大发射波长为525nm；JC-10 聚合物的最大激发波长为540nm，最大发射波长为590nm。

与 JC-1 相比，JC-10 水溶性更好、不易析出沉淀，染色均一性与检测灵敏度更高，能够降低实验假阳性，帮助使用者获得更稳定可靠的实验数据。

本试剂盒提供了 CCCP(10mM) 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，共可以检测100个样品；对于12孔板中的样品，共可以检测200个样品。

使用方法

1.　JC-10染色工作液的配制：

六孔板每孔所需JC-10染色工作液的量为1mL，其它培养器皿的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。剧烈涡旋，充分溶解并混匀JC-10，可以再在室温下放置1-2分钟以确保JC-10完全溶解。然后再加入2mL JC-10染色缓冲液(5×)，混匀后即为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)根据细胞不同推荐按照1:1000--1:100的比例加入到细胞培养液中稀释，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。CCCP可以与JC-10同时添加，但是对于特定的细胞，CCCP的作用浓度和作用时间可能会有所不同，需自行参考相关文献资料确定。

3. 对于悬浮细胞：

【注】如果最后希望用流式细胞仪检测，建议另外准备一份未经染色的细胞作为阴性对照。

1) 取50-100万细胞，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。

2) 加入0.5mL JC-10染色工作液，颠倒数次混匀。细胞培养箱中37℃孵育20分钟。

【注】由于流式检测比较灵敏，使用的JC-10浓度可能要比荧光显微镜检测时低，此时可根据细胞类型和实际染色情况对JC-10稀释倍数进行适当调整。

3) 在孵育期间，按照每1mL JC-10染色缓冲液(5×)加入4mL超纯水的比例，配制适量的JC-10染色缓冲液(1×)，并放置于冰浴。

4) 37℃孵育结束后，600×g 4℃离心3-4分钟，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。

5) 用事先冰浴的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，600×g 4℃离心3-4分钟，沉淀细胞，弃上清。重复一次。

6) 清洗两次后，用适量JC-10染色缓冲液(1×)重悬，使用流式细胞仪分析，也可用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜进行观察。

4. 对于贴壁细胞：

【注】对于贴壁细胞，如果希望用流式细胞仪检测，可以先收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

1) 对于六孔板的一个孔，吸除细胞培养液，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。

2) 加入1mL JC-10染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中37℃孵育20分钟。

3) 在孵育期间，按照每1mL JC-10染色缓冲液(5×)加入4mL超纯水的比例，配制适量的JC-10染色缓冲液(1×)，并放置于冰浴。

4) 37℃孵育结束后，吸除上清，用事先冰浴的JC-10染色缓冲液(1×)轻轻洗涤2次。

5) 加入2mL细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。

6) 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：

1) 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。

2) 在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。

3) 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。

4) 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聚合物（正常膜电位）时，可以把激发光设置为525nm，发射光设置为590nm；检测JC-

10单体（膜电位下降）时，可以把激发光设置为490nm，发射光设置为530nm。

【注】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，但应尽量避免使用490nm作为JC-10聚合物的激发波长，因为该波长可同时激发JC-10单体和聚合物，从而影响检测的特异性，建议选择约560nm的激发波长用于检测JC-10聚合物。

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；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。

如使用流式细胞仪分析，可以使用FITC (Ex/Em=488/525nm)通道来检测JC-10单体，使用PE (Ex/Em=561/585nm)通道来检测JC-10聚合物。通过计算红/绿荧光强度比值(Red/Green Fluorescence Intensity Ratio)的变化，可反映线粒体膜电位的变化情况，比值下降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。

保存条件

-20℃保存，自生产之日起12个月有效。JC-10(200×)需避光保存，并尽量避免反复冻融；超纯水和JC-10染色缓冲液(5×)可2-8℃保存。

注意事项

1. JC-10(200×)可以20-25℃水浴温育片刻至全部融解后使用。在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。
2. JC-10是光敏物质，在保存与操作时请注意避光。
3. 配制JC-10染色工作液时，必须先把JC-10(200×)用试剂盒提供的超纯水充分溶解涡旋混匀后，才可以加入JC-10染色缓冲液(5×)。若先配制JC-10染色缓冲液(1×)再加入JC-10(200×)，可能会导致JC-10溶解不充分，影响后续的检测。
4. 样品应该保持在冰上并尽快分析，最好不要超过染色后30分钟。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×)。
5. 若发现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℃加热。使用时请保证无菌操作，避免染菌。
6. 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。
7. 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。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

大连美仑生物技术有限公司
官网:https://www.meilunbio.com/
电话/邮箱:0411-62910999 sales@meilune.com
本产品仅供科研使用