

细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)

50T WLA145a 100T WLA145b

Wanleibio



仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

产品名称

细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)

产品概述

JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential) $\Delta\psi_m$ 的理想荧光探针。可以检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位。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 (J-aggregates), 可以产生红色荧光; 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 (monomer), 可以产生绿色荧光。这样就可以非常方便地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, 同时也可以利用 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变作为细胞凋亡早期的一个检测指标。

线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) (Mitochondrial membrane potential assay kit with JC-1) 是一种以 JC-1 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。

包装信息

试剂名称	WLA145a (50T)	WLA145b (100T)	保存条件
JC-1 (200×)	250μl	500μl	-20°C
5× Incubation	40ml	80ml	2-8°C
超纯水	45ml	90ml	2-8°C
CCCP (10mM)	10μl	20μl	-20°C

注意事项

- JC-1 (200×) 在较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内, 待全部融解后使用。
- 必须先把 JC-1 (200×) 用超纯水充分溶解混匀后, 才可以加入 JC-1 染色缓冲液 (5×)。否则会严重影响后续的检测。
- 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°C 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 min 内完成后续检测。在检测前需冰浴保存。
- 请勿把 JC-1 染色缓冲液 (5×) 全部配制成 JC-1 染色缓冲液 (1×), 本试剂盒使用过程中需直接使用 JC-1 染色缓冲液 (5×)。

操作流程

1. JC-1 染色工作液的配制:

- 六孔板每孔所需 JC-1 染色工作液的量为 1 ml, 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 50-100 万细胞需 0.5 ml JC-1 染色工作液。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。剧烈 Vortex 充分溶解并混匀 JC-1。然后再加入 2 ml JC-1 染色缓冲液 (5×), 混匀后即为 JC-1 染色工作液。
- 阳性对照的设置: 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, 处理细胞 20 分钟。随后装载 JC-1, 进行线粒体膜电位的检测。对于特定的细胞, CCCP 的作用浓度和作用时间可能有所不同, 需自行确定。

2. 对于悬浮细胞:

- 取 10~60 万细胞, 重悬于 0.5 mL 细胞培养液中, 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。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 min。
- 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×), 并放置于冰浴。
- 37°C 孵育结束后, 600 g 4°C 离心 3~4 min, 沉淀细胞。弃上清, 注意尽量不要吸除细胞。
- 用 JC-1 染色缓冲液 (1×) 洗涤 2 次: 加入 1 mL JC-1 染色缓冲液 (1×) 重悬细胞, 600 g 4°C 离心 3~4 min, 沉淀细胞, 弃上清。再加入 1 mL JC-1 染色缓冲液 (1×) 重悬细胞, 600 g 4°C 离心 3~4 min, 沉淀细胞, 弃上清。

细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)

50T WLA145a 100T WLA145b



仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

6) 再用适量 JC-1 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, 也可以用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

3. 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。

1) 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 1 mL 细胞培养液。细胞培养液中可以含有血清和酚红。

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

3) 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×), 并放置于冰浴。

4) 37 °C 孵育结束后, 吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲液 (1×) 洗涤 2 次。

5) 加入 2 mL 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。

4. 对于纯化的线粒体:

1) 把配制好的 JC-1 染色工作液再用 JC-1 染色缓冲液 (1×) 稀释 5 倍。

2) 0.9 mL 5 倍稀释的 JC-1 染色工作液中加入 0.1 mL 总蛋白量为 10~100 μg 纯化的线粒体, 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中孵育 10-20 min。

3) 用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜观察或荧光酶标仪分析。

观察方法

1. 荧光显微镜观察

检 JC-1 单体时可以把激发光设置为 490 nm, 发射光设置为 530 nm; 检测 JC-1 聚合物时, 可以把激发光设置为 525 nm, 发射光设置为 590 nm。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. 流式细胞仪分析

用流式细胞仪检测 (Ex=488 nm; Em=530 nm) 细胞凋亡的情况, 绿色荧光通过 FITC 通道来检测, 通常为 FL1; 红色荧光通过 PE 通道来检测, 通常 FL2。例如下述实验图例: 正常细胞 {FITC 亮, PE 亮; Q3-2}, 凋亡细胞 {FITC 亮, PE 暗; Q3-4}, 设门的位置根据细胞种类、实验条件等不同而变化, 试验需设未经处理的正常细胞为阴性对照组和阳性对照组, 根据阴性和阳性对照组的双参数散点图来设定门的位置。

3. 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 485 nm, 发射波长为 590 nm, 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。

用凋亡诱导剂诱导 Siha 细胞凋亡, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 2h, 利用万类细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒进行检测, 流式检测后结果如下:

产品图片

