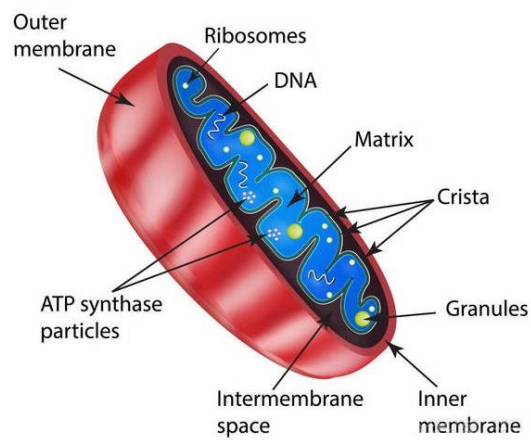




线粒体膜电位检测试剂盒

Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



线粒体膜电位检测试剂盒

Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

一、产品描述

Boxbio[®] Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit 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，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。

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，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中形成聚合物，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，可以产生绿色荧光。通过荧光颜色的转变即可检测线粒体膜电位的变化。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件
JC-1 (200×)	液体 100 μ L×5 支	-20°C保存
Ultra Pure Water	液体 90 mL×1 瓶	-20°C保存
JC-1 Dyeing Buffer (5×)	液体 80 mL×1 瓶	-20°C保存
Positive Control CCCP (10 mM)	液体 20 μ L×1 支	-20°C保存

三、产品使用说明

1. 试剂准备

①**JC-1 染色工作液-1 的配制**：六孔板每孔所需 JC-1 染色工作液-1 的量为 1 mL，其他培养器皿的 JC-1 染色工作液-1 的用量以此类推；对于细胞悬液每 50-100 万细胞需 500 μ L JC-1 染色工作液-1。取适量 JC-1 (200×)，按照每 50 μ L JC-1 (200×) 加入 8 mL Ultra Pure Water 的比例稀释，剧烈震荡充分溶解，再加入 2 mL JC-1 Dyeing Buffer (5×)，充分混匀后即为 **JC-1 染色工作液-1**；

②**JC-1 Dyeing Buffer (1×) 的配制**：根据使用量按照 JC-1 Dyeing Buffer (5×)：H₂O=1:4 的体积比配制为 JC-1 Dyeing Buffer (1×)，冰浴保持低温放置。

2. 阳性对照的设置

将 CCCP (10 mM) 推荐按照 1 : 1000 的比例加入到细胞培养液中, 使终浓度为 10 μ M, 处理细胞 20 min, 随后按照下述方法装载 JC-1, 进行线粒体膜电位的检测。通常 10 μ M CCCP 处理 20 min 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 JC-1 染色后应显示红色荧光。对于特定的细胞, CCCP 浓度和作用时间可能有所不同, 需根据预实验或参考文献设定。

3. 装载探针

(1) 收集细胞后装载探针 (适用于贴壁培养细胞和悬浮细胞)

- ①收集 10-60 万细胞, 重悬于 500 μ L 细胞培养液中, 加入 500 μ L JC-1 染色工作液-1 充分混匀;
- ②37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内孵育 20 min, 每隔 5 min 颠倒混匀一次, 使探针和细胞充分接触;
- ③4 $^{\circ}$ C 600 g 离心 3 min, 弃上清, 收集沉淀, 使用 JC-1 Dyeing Buffer (1 \times) 洗涤沉淀 2-3 次, 使用 JC-1 Dyeing Buffer (1 \times) 重悬沉淀, 即可使用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察, 或使用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

(2) 原位装载探针 (仅适用于贴壁培养细胞)

- ①去除细胞培养液, 使用 PBS 洗涤细胞一次, 加入 1 mL 新鲜细胞培养液, 再加入 1 mL JC-1 染色工作液-1 充分混匀;
- ②37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内孵育 20 min, 每隔 5 min 颠倒混匀一次, 使探针和细胞充分接触;
- ③去除上清, 使用 JC-1 Dyeing Buffer (1 \times) 洗涤沉淀 2-3 次, 加入 2 mL 细胞培养液, 即可使用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察。

(3) 纯化的线粒体装载探针

- ①JC-1 染色工作液-2 的制备: 将 JC-1 染色工作液-1 使用 JC-1 Dyeing Buffer (1 \times) 稀释 5 倍;
- ②吸取 900 μ L JC-1 染色工作液-2 加入 100 μ L 纯化的线粒体 (总蛋白量为 10-100 μ g), 使用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察。

4. 荧光观察和结果分析

- ①检测 JC-1 单体: 使用 490 nm 激发波长, 530 nm 发射波长;
- ②检测 JC-1 聚合物: 使用 525 nm 激发波长, 590 nm 发射波长;

注: 测定荧光时无需将激发波长和发射波长设置为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 单体时可以参考观察 GFP 或 FITC 时的设置; 检测 JC-1 聚合物时可以参考观察碘化丙啶或 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, 细胞的状态也比较正常。

四、注意事项

- ①JC-1 (200×) 低温条件下可能出现凝固, 建议 25°C 水浴孵育至完全融解后使用;
- ②JC-1 探针装载完成后需置于冰上低温放置, 并在 30 min 内完成检测;
- ③若 JC-1 Dyeing Buffer (5×) 中出现沉淀, 建议 37°C 水浴孵育至完全融解后使用;
- ④CCCP 为线粒体电子传递链抑制剂, 具有一定毒性, 请注意做好防护;
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失, 测定前请仔细阅读说明书 (以实际收到说明书内容为准), 确认试剂储存和准备是否充分, 操作步骤是否清楚, 且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定, 过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

