

Version 1

Code No. AG51010

CytoDet JC-10 线粒体膜电位 检测试剂盒

CytoDet JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本产品是基于 JC-10 荧光探针的能快速灵敏地检测细胞线粒体膜电位变化的试剂盒，可以用于早期细胞凋亡的检测。

JC-10 是一种水溶性好，广泛应用于检测线粒体膜电位 $\Delta \Psi_m$ 的荧光探针，以电势依赖性的方式聚集在线粒体内。在正常线粒体中，线粒体膜电位较高，JC-10 聚集在线粒体基质中形成聚合物，发出强烈的红色荧光；在不健康的线粒体中，由于线粒体膜电位的下降或丧失，JC-10 以单体形式存在于胞浆中，产生绿色荧光。因此可使用荧光显微镜或流式细胞仪检测 JC-10 荧光的发射波长变化，反映线粒体膜电位的变化。

线粒体膜电位的丧失是细胞凋亡早期发生的一个标志性事件。当细胞受到凋亡信号刺激后，细胞内线粒体膜电位会改变，膜通透性增加，使得包括细胞色素 C 在内的线粒体蛋白从线粒体基质释放到胞浆中。细胞色素 C 的释放伴随着膜电位的完全丧失，从而引发细胞凋亡的级联反应。

CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) 是一种强效的线粒体氧化磷酸化解偶联剂，促使线粒体内膜对 H^+ 产生通透性，导致线粒体的膜电位丧失。本产品提供了 CCCP 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。

➤ 产品组成

组分名称	AG51010 (100 rxns)
JC-10 (200 μ M)	200 μ l X 5 pcs
CCCP (50 mM)	50 μ l

➤ 保存

保存温度：-20℃避光保存

运输温度：-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. 能快速灵敏的检测细胞线粒体膜电位变化，可以用于早期细胞凋亡的检测。
2. 可以使用多种荧光检测仪器进行检测（例如流式细胞仪、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜和荧光分光光度计等）。
3. 试剂盒搭配有 CCCP，能诱导线粒体膜电位下降，在实验中可作为阳性对照确保实验的准确性。

➤ 实验原理

JC-10 是一种膜透过性染料，可选择性的进入线粒体膜内。在正常线粒体中，线粒体膜电位较高，JC-10 聚集在线粒体基质中形成聚合物，发出强烈的红色荧光；在不健康线粒体中，由于线粒体膜电位的下降或丧失，JC-10 以单体形式存在于胞浆中，产生绿色荧光。

检测 JC-10 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-10 聚合物时可以把激发光设置为 525 nm，发射光设置为 590 nm。

- ✚ 当使用荧光显微镜观察时，凋亡或坏死细胞可以用蓝色激发光进行激发，活细胞可以用绿色荧光进行激发。
- ✚ 当使用流式细胞仪检测时，可选用 488 nm 进行激发，使用检测 FITC（绿色）的通道检测凋亡或坏死细胞，使用检测 PE（红色）的通道检测活细胞。

➤ 实验前准备

1. 试剂&耗材：

PBS 或其它合适的缓冲液（如 DPBS、细胞培养液）、细胞或组织样本、细胞培养皿、1.5 ml 离心管等。

2. 仪器：

荧光检测仪器（例如荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪或荧光分光光度计等）、桌面离心机、振荡器、移液器等。

➤ 注意事项

1. JC-10 需避光保存，实验过程中注意避光操作。
2. JC-10（200 μ M）在 4°C、冰浴等低温情况下会凝固，可能会析出产生沉淀，如果出现沉淀，可以在 20~25°C 水浴温育使其全部溶解。
3. JC-10 染色完成后尽量在 30 min 内完成后续检测，避免长时间处理导致细胞状态不好，影响实验结果判定。
4. 可使用本产品中配置的 CCCP 作为阳性对照，诱导线粒体膜电位改变：将 CCCP（50 mM）按 1：1000 比例加到细胞培养液中【例如取 10 μ l CCCP（50 mM）加入至 10 ml 的培养基中，将 CCCP 稀释至 50 μ M】，然后将细胞放置在 37°C 培养箱孵育 15 min 诱导线粒体膜电位下降。对于大多数细胞而言，终浓度为 50 μ M 的 CCCP 处理 15 min 后线粒体膜电位会完全丧失，用 JC-10 染色后细胞呈现绿色；正常细胞经 JC-10 染色后呈现红色。不同的细胞，CCCP 的作用浓度和时间可能有所不同，需根据实验结果优化反应条件。

➤ 操作方法

A. 悬浮细胞

1. 取 $1\sim 10 \times 10^5$ 个细胞，重悬于 1 ml 细胞培养液中（血清和酚红对实验无影响）。
2. 加入 $10 \mu\text{l}$ JC-10 ($200 \mu\text{M}$)，使其终浓度为 $2 \mu\text{M}$ ，加入时均匀缓慢的滴加到细胞培养液中，并用移液器吹打混匀，然后将细胞放置于培养箱中 37°C 孵育 30 min。【注：不同细胞的染色效果不一样，可以根据实际情况进行调整 JC-10 反应终浓度。】
【可选步骤】如果背景较高，可以在染色完成之后，使用预冷的 PBS 洗涤细胞一次： $400 \times g$ 4°C 离心 5 min，去除培养基；然后加入 1 ml PBS 重悬细胞， $400 \times g$ 4°C 离心 5 min，沉淀细胞，弃上清，再用 1 ml PBS 重悬细胞后进行检测。
3. 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察，也可以使用流式细胞仪分析。

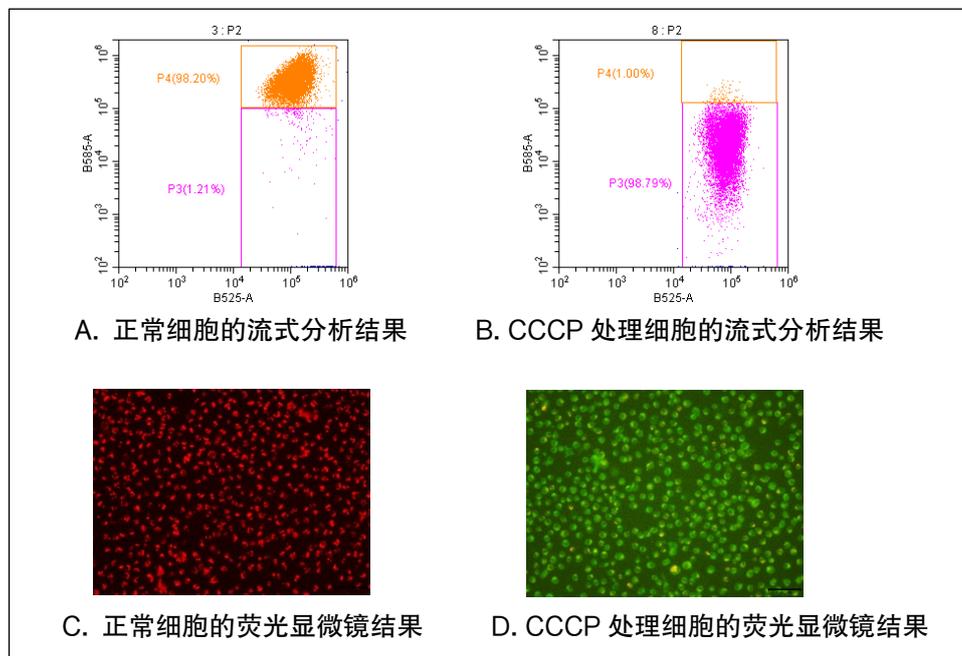
B. 贴壁细胞（以 6 孔板为例）

对于贴壁细胞，如果要采用流式细胞仪分析或荧光分光光度计检测，可以先消化收集细胞，重悬后参考 <A.悬浮细胞> 的检测方法。如果采用荧光显微镜拍照观察，则可直接参照下述步骤进行。

1. 配制 JC-10 染色工作液：使用细胞培养基将 JC-10 ($200 \mu\text{M}$) 稀释成终浓度为 $2 \mu\text{M}$ 的染色工作液，剧烈振荡使其充分溶解混匀。
【注：不同细胞的染色效果不一样，可以根据实际情况进行调整 JC-10 反应终浓度。】
2. 将细胞中的培养基去除（根据需要可使用 PBS 清洗细胞一次，并去除 PBS），取 1 ml JC-10 染色工作液直接加入细胞中，轻轻晃动孔板使染色液完全覆盖细胞（此处以 6 孔板为例，其余孔板根据大小进行调整，例如 12 孔板加入 0.5 ml，24 孔板加入 0.25 ml），然后将细胞放置于培养箱中 37°C 孵育 30 min。
【可选步骤】如果背景较高，可以在染色完成之后，使用预冷的 PBS 洗涤细胞一次：去除培养基，加入 1 ml PBS 覆盖细胞，轻轻晃动培养皿，然后去除 PBS，再加入 1 ml PBS 后进行检测。
3. 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察。

➤ 实验例

1. 经 CCCP 处理 15 min 和未处理的 Jurkat 细胞，分别使用 JC-10 (终浓度 $2\ \mu\text{M}$) 进行染色，使用流式细胞仪和荧光显微镜观察，结果如下图所示，经 CCCP 处理的细胞呈现绿色，正常细胞呈现红色。



➤ 产品注意事项

1. 不同细胞所需染色液浓度不一样，可以根据实际结果进行调整。JC-10 染色终浓度较低，可能会出现染色荧光较弱，可以增加 JC-10 的染色终浓度。
2. 使用荧光显微镜检测时，如果荧光强度较低，可适当增加 JC-10 浓度；如果荧光强度较高，可适当降低 JC-10 浓度。
3. JC-10 染色完成后，尽快进行后续检测，避免长时间处理导致细胞状态不好，影响实验结果判定。
4. 本产品用于检测细胞线粒体膜电位，进行实验时需要注意防止细菌或真菌污染，需要使用无菌的器具，操作过程中要在生物安全柜中操作，避免讲话，且需要穿实验服，戴一次性口罩和手套等防止菌污染。