

JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

Cat# CA0202

产品概述

JC-1 和 JC-10 均为用于检测线粒体膜电位变化的荧光探针。JC-1 虽然在许多实验室中被广泛使用，但其水溶性差造成了极大的不便。即使在 1 μM 浓度下，JC-1 也容易在水相缓冲液中析出。JC-10 是在需要高染料浓度时 JC-1 的优良替代品。与 JC-1 相比，JC-10 具有更好的水溶性。但 JC-10 的性能表现极具细胞依赖性特征。

在线粒体膜电位较高时，JC-10 聚集在线粒体的基质中，形成聚合物，可产生红色荧光；在线粒体膜电位较低时，JC-10 不能聚集在线粒体的基质中，此时 JC-10 为单体，产生绿色荧光。因此可通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化，以红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。常用流式细胞仪进行检测，绿色荧光可用 FL1 通道分析，红色荧光可用 FL2 通道分析。此外，也可用于荧光成像和荧光酶标板检测系统进行测试。

本试剂盒是基于通过阳离子亲脂性的 JC-10 染料检测细胞线粒体膜电位变化。在正常细胞中，JC-10 集中在线粒体基质中形成红色荧光聚集体。然而，在凋亡和坏死细胞中，JC-10 向线粒体外扩散。JC-10 变成单体形式，呈现绿色荧光。本品也可用于筛选凋亡激活因子和抑制因子。该检测可以在 96 孔和 384 孔荧光微量滴度板中进行。

表 1 JC-10 探针的光谱特征

探针形式	Ex	Em
JC-10 单体	515 nm	529 nm
JC-10 聚合物	540 nm	590 nm

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。

产品/组分信息

组分编码	组分	规格
CA0202-100T-1	JC-10 (200×)	5× 100 μL/管
CA0202-100T-2	JC-10 染色缓冲液 (5×)	80 mL
CA0202-100T-3	CCCP (10 mM)	20 μL
CA0202-100T-4	超纯水	90 mL

储存方式

-25~-15℃ 避光保存； 避免反复冻融。超纯水和 JC-10 染色缓冲液 (5×) 也可 4℃保存。

使用说明

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 1 mL，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 50-100×10⁴ 个细胞需 0.5 mL JC-10 染色工作液。取适量 JC-10 (200×)，按照每 50 μL JC-10 (200×) 加入 8 mL 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 2 mL JC-10 染色缓冲液 (5×)，混匀后即为 JC-10 染色工作液。

【注】：

1. JC-10 (200×)在 4℃、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可以用 20 ~ 25℃水浴温育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。

阳性对照的设置

把试剂盒中提供的 CCCP (10 mM)推荐按照 1:1000 的比例加入到细胞培养液中，稀释至 10 μM，处理细胞 20 min。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 10 μM CCCP 处理 20 min 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确定。

【注】：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。

对于悬浮细胞

1. 取 10-60×10⁴ 个细胞，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。
2. 加入 0.5 mL JC-10 染色工作液，颠倒数次混匀。细胞培养箱中 37℃ 孵育 20 min。
3. 在孵育期间，按照每 1 mL JC-10 染色缓冲液 (5×) 加入 4 mL 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。
4. 37℃ 孵育结束后，600g 4℃ 离心 3-4 min，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。
5. 用 JC-10 染色缓冲液 (1×) 洗涤 2 次：加入 1 mL JC-10 染色缓冲液 (1×) 重悬细胞，600g 4℃ 离心 3-4 min，沉淀细胞，弃上清。再加入 1 mL JC-10 染色缓冲液 (1×) 重悬细胞，600g 4℃ 离心 3-4 min，沉淀细胞，弃上清。
6. 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，也可以用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

【注】：

1. 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℃ 左右，此时的洗涤效果较好。
2. JC-10 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。
3. 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×)。
4. 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℃ 加热。

对于贴壁细胞

【注】：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-10 染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中 37℃ 孵育 20 min。
3. 在孵育期间，按照每 1 mL JC-10 染色缓冲液 (5×) 加入 4 mL 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。
4. 37℃ 孵育结束后，吸除上清，用 JC-10 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。

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. 0.9 mL 5 倍稀释的 JC-10 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。

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 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。另外，也可以参考下面步骤“荧光检测和结果分析”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：方法同下面步骤“荧光检测和结果分析”。

荧光检测和结果分析

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。

【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。如使用荧光显微镜观察，检测 JC-10 聚合物时可参考其他红色荧光设置，如碘化丙啶或者 Cy3 的设置。检测 JC-10 单体可使用常用来检测绿色荧光化合物如 FITC 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。

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

CYTOCH