

## JC-10 线粒体膜电位检测试剂盒

### JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

产品编号	产品名称	包装规格
NBS3207	JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit JC-10 线粒体膜电位检测试剂盒	100T

#### 产品简介:

JC-10 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit) 是一种以 JC-10 为荧光探针, 快速且灵敏的检测细胞、组织或纯化线粒体膜电位变化的试剂盒。因线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件。因此本试剂盒可用于早期的细胞凋亡检测。

JC-10 是一种新型的用来监测线粒体膜电位变化的荧光探针, 是 JC-1 的优越替代物。与 JC-1 相比, 具有以下几个重要优势: 1) 溶解性得以改良——在水溶液中形成沉淀可能性明显降低; 2) 使用更方便——简化步骤将手动操作时间最小化; 3) 荧光信号更高——改良的信号与背景荧光的信噪比; 4) 结果更稳定——优化探针以保证更连续性和稳定性结果。

JC-10 是一种替换 JC-1, 用于检测线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的理想荧光探针。JC-10 以电势依赖性的方式积聚在线粒体内, 可以用来检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位。正常线粒体内, JC-10 聚集在线粒体基质中形成聚合物, 聚合物发出强烈的红色荧光 (Ex=540 nm, Em=590 nm); 不健康的线粒体由于膜电位的下降或丧失, JC-10 只能以单体的形式存在于胞浆中, 产生绿色荧光 (Ex=490 nm, Em=525 nm)。JC-10 不仅可用于定性检测, 因颜色的变化可以非常直接的反映出线粒体膜电位的变化。也可以用于定量检测, 因线粒体的去极化程度可以通过红/绿荧光强度的比例来衡量。

本试剂盒提供 CCCP 用作线粒体膜电位丧失的阳性对照。对于六孔板样品, 本试剂盒可检测 100 个样品。

#### 保存条件:

-20°C保存, 1 年有效。

**产品组成:**

组分	名称	规格	保存条件
NBS3207-A	JC-10 (200×)	5×100μl	-20℃避光, 避免反复冻融
NBS3207-B	JC-10 染色缓冲液 (5×)	80ml	-20℃或 4℃
NBS3207-C	超纯水	90ml	-20℃或 4℃
NBS3207-D	CCCP (10mM)	20μl	-20℃

**产品使用:****1. C-10 染色工作液制备**

对于六孔板, 每孔所需 JC-10 染色工作液的量为 1ml, 其他培养器皿的 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。剧烈震荡充分溶解并混匀 JC-10。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。

**【注意】:** 必须先把 JC-10 (200×) 用超纯水 (试剂盒提供) 充分溶解混匀后, 才可加入 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。

**2. 阳性对照的设置**

CCCP (10mM) 推荐按 1 : 1000 的比例加入到细胞培养液中, 稀释至 10μM, 处理细胞 20min。随后按照下述方法装载 JC-1, 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 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 染色后应显示绿橙色荧光。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决定。

**3. 对于悬浮细胞**

- 1) 取 10~60 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 20min。
- 3) 孵育期间, 按照每 1mL JC-10 染色缓冲液 (5×) 加入 4mL 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, 600×g 4℃离心 3~4min 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 1mL JC-10 染色缓冲液 (1×) 重悬细胞, 600×g 4°C离心 3~4min 沉淀细胞, 弃上清。再加入 1mL JC-10 染色缓冲液 (1×) 重悬细胞, 600×g 4°C离心 3~4min 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。

#### 4. 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方法进行检测。

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°C 孵育 20min。

3) 孵育期间, 按照每 1mL JC-10 染色缓冲液 (5×) 加入 4mL 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°C 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 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) 将配制好的 JC-10 染色工作液再用 JC-10 染色缓冲液 (1×) 稀释 5 倍。

2) 0.9mL 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 490nm, 发射波长为 590nm。如果使用荧光酶标仪, 激发波长不能设置为 490nm 时, 可在 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 单体时可以把激发光设置为 490nm, 发射光设置为 525nm; 检测 JC-10 聚合物时, 可以把激发光设置为 540nm, 发射光设置为 595nm。

**【注 1】:** 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 聚合物时可使用常来检测 TRITC 用的标准带通滤波器。检测 JC-10 单体可使用常来检测 FITC 或 GFP 的标准带通滤波器。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。出现绿橙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。

**【注 2】:** 由于红色的 JC-10 信号淬灭比绿色快，所以用标准带通滤波器检测时先检测红色荧光。

#### 注意事项:

1. JC-10 (200×) 在 4°C、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 20~25°C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
2. 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°C 左右，此时洗涤效果较好。
3. JC-10 探针装载完并洗涤后尽量在 30min 内完成后续检测。在检测前需冰浴保存。
4. 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. 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，可在 37°C 加热促进溶解。
6. CCCP 为线粒体电子传递链抑制剂，有毒，请注意小心防护。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装规格
<u>NBS3202-200ul</u>	<u>JC-1 (5mg/ml in DMSO) 线粒体膜电位荧光探针</u>	200μl
<u>NBS3203-1mg</u>	<u>JC-1 (Powder)线粒体膜电位荧光探针 (粉末)</u>	1mg
<u>NBS3204</u>	<u>JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit</u>	100T
<u>NBS3205-500ul</u>	<u>JC-10 (2mg/ml in DMSO) 线粒体膜电位荧光探针</u>	500ul
<u>NBS3206-1mg</u>	<u>JC-10 for Mitochondrial Membrane Potential</u>	1mg
<u>NBS3207</u>	<u>JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit</u>	100T
<u>NBS3208-5mg</u>	<u>Rhodamine 123 罗丹明 123 (线粒体膜电位荧光探针)</u>	5mg
<u>NBS3209</u>	<u>Rhodamine 123 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit</u>	100T