

## 概述

细胞中的线粒体作为有氧呼吸产生ATP的主要场所，是体内重要的细胞器之一，常被用于早期细胞毒性、氧化应激、细胞凋亡等研究中<sup>1)</sup>。线粒体活性的降低与机能失调，已被证实与癌症、衰老、神经退化性疾病(如阿尔兹海默、帕金森等)等密切相关<sup>2)3)</sup>。

JC-1是一种被广泛使用的小分子线粒体膜电位探针，依赖于线粒体膜电位在线粒体中聚集，染料伴随聚集过程，荧光从绿色(530 nm)变为红色(590 nm)。当线粒体发生去极化，红/绿荧光强度比值降低。

以往的研究者反应，JC-1不易溶于水并有大量沉淀产生。但与其他公司的产品不同，同仁化学研究所研制的JC-1试剂解决了这一问题，避免了沉淀的产生。同时使用试剂盒中的配制的成像缓冲液(Imaging Buffer)，可大幅降低荧光背景并在检测过程中保护细胞不受损伤。

## 试剂内含

JC-1 Dye	100 nmo × 1
Imaging Buffer (10 ×)	6 ml × 1

## 储存条件

在0-5 保存

## 所需的设备和材料

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 培养基或HBSS缓冲液
- 移液器，
- 微管

## 注意事项

## 配制1-2 mmol/L的JC-1 DMSO储存液

按照下方表格，取适量的DMSO加入100 nmol的JC-1 Dye管中，移液器吹打使紫红色固体溶解。

\* 制备好的DMSO储存液可在-20 下避光保存1个月。

表格1. JC-1浓度与DMSO添加量

JC-1	DMSO
1 mmol/L	100 $\mu$ L
2 mmol/L	50 $\mu$ L

配制1-15  $\mu$ mol/L的JC-1工作液

取适量JC-1 DMSO储存液转移至微管中后，加入适量的培养基立即吹打10次混匀。

(例：2  $\mu$ mol/L的JC-1工作液配制) 转移 2  $\mu$ l的浓度为1 mmol/l的JC-1 DMSO储存液至微管中，加入1 ml的培养基后立即吹打10次混匀。

- \* 配制working solution时请将DMSO储存液与培养基平衡至室温。
- \* 根据实际用量计算所需的DMSO母液与培养基的体积，培养基中加入DMSO储存液后，染料有可能析出，请严格按以上流程操作。
- \* JC-1工作液浓度与孵育时间，与细胞特点有关，具体参数可能需要调整。
- \* 配制好的工作液，建议现配现用并在一天内用完。

## 配制Imaging Buffer solution

使用超纯水稀释Imaging Buffer (10 ×)10倍。

\* 稀释后的溶液请在一天内使用。建议使用前计算使用量，避免浪费。

## 操作步骤

## JC-1染色

1. 在培养皿或载玻片中接种细胞后，在37 5% CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养。
2. 加入预先配好的JC-1工作液。
3. 在37 5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育30-60min。
4. 除去上清液，用HBSS洗涤细胞2次
5. 加入Imaging Buffer Solution后在荧光显微镜下观察细胞。

一、使用羰基氰化物间氯苯腙 (CCCP) 处理HeLa细胞后的线粒体膜电位变化

1. 转移200  $\mu$ l细胞密度为 $2.4 \times 10^5$  cells/ml的MEM (10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素) 至 $\mu$ -slide 8 well plate (ibidi公司)中37 5% CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养。
2. 弃上清液后分别加入200  $\mu$ l的含有CCCP的MEM (CCCP浓度分别为0、100  $\mu$ mol/l) , 37 5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育90min。
3. 吸出100  $\mu$ l上清液后, 加入MEM培养基稀释的JC-1工作液 (4  $\mu$ mol/l, 100  $\mu$ l) 后在37 5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育30 min。
4. 去除上清后使用200  $\mu$ l HBSS洗涤细胞2次。
5. 加入200  $\mu$ l的Imaging Buffer solution后在荧光显微镜下观察细胞。

荧光参数 :

Green:Ex=488 nm, Em= 500-550 nm

Red : Ex=561 nm, Em=560-610 nm

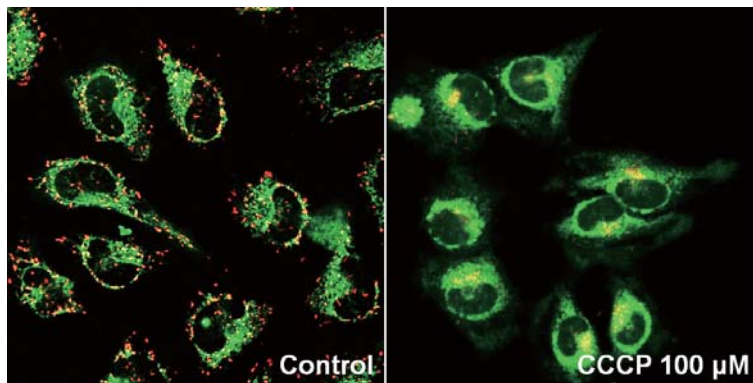


图1. HeLa细胞的线粒体膜电位成像 (CCCP加入前后)

二、使用羰基氰对三氟甲氧基苯腙 (FCCP) 处理HeLa细胞后的线粒体膜电位变化

1. 转移200  $\mu$ l细胞密度为 $2.4 \times 10^5$  cells/ml的MEM培养基 (10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素) 至 $\mu$ -slide 8 well plate (ibidi公司)中37 5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育过夜。
2. 去除上清后分别加入200  $\mu$ l的含有FCCP的MEM培养基 (FCCP浓度分别为0、100  $\mu$ mol/l) , 37 5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育30 min。
3. 吸出100  $\mu$ l上清液后, 加入MEM稀释的JC-1工作液 (4  $\mu$ mol/l, 100  $\mu$ l) 后在37 5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育30 min。
4. 弃上清液后使用200  $\mu$ l HBSS洗涤细胞2次。
5. 加入200  $\mu$ l的Imaging Buffer solution后在荧光显微镜下检测细胞。

荧光参数 :

Green:Ex=488 nm, Em= 500-550 nm

Red : Ex=561 nm, Em=560-610 nm

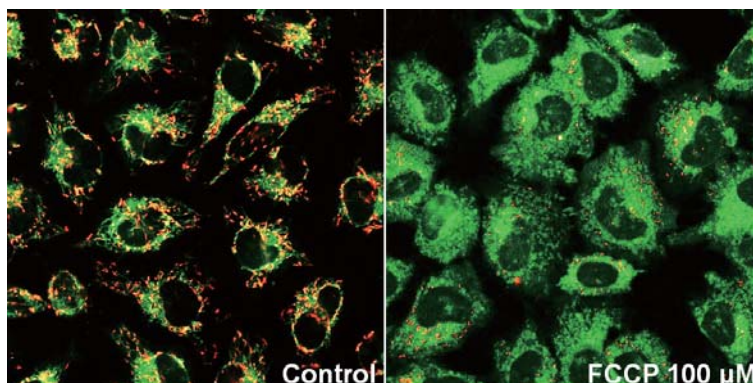
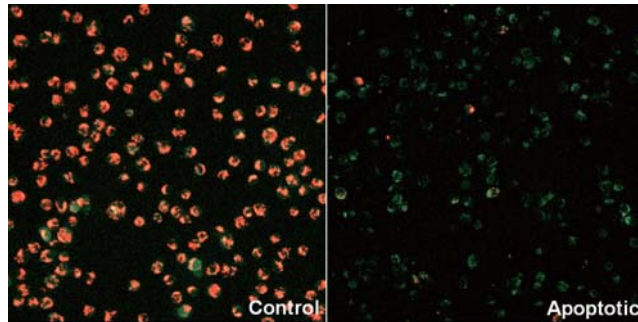


图2. HeLa细胞的线粒体膜电位成像 (FCCP加入前后)

### 三、检测Jurkat细胞诱导凋亡后的线粒体膜电位变化 (荧光成像与流式细胞仪, 约12次)

1. 转移2 ml细胞密度为 $1.0 \times 10^6$  cells/ml的RPMI培养基 (10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素) 至5 ml微管中。
2. 去除上清后分别加入2ml的含有Staurosporine的RPMI培养基 (Staurosporine浓度分别为0、2.5  $\mu\text{g/l}$ ) , 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育150 min。
3. 加入RPMI培养基稀释的JC-1工作液 (4  $\mu\text{mol/l}$ , 2 ml) 后在37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育30 min。
4. 去除上清后使用200  $\mu\text{l}$  HBSS洗涤细胞2次。
5. 加入2 ml的Imaging Buffer solution后可使用荧光显微镜、荧光酶标仪、流式细胞仪等方法检测荧光。

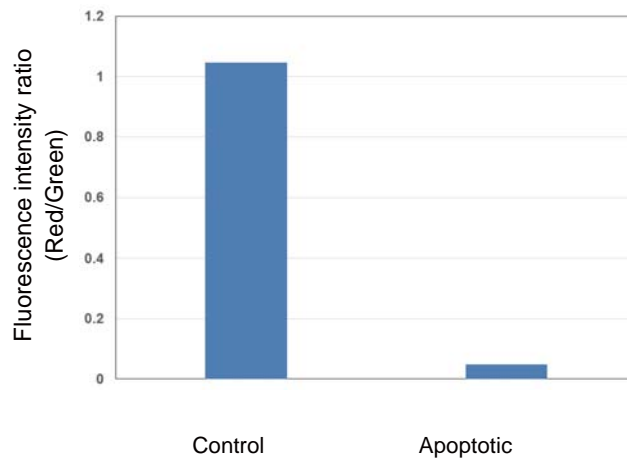


荧光参数：

Green : Ex=488 nm, Em= 500-550 nm

Red : Ex=561 nm, Em=560-610 nm

图3. Jurkat细胞的线粒体膜电位成像 (Staurosporine诱导凋亡)

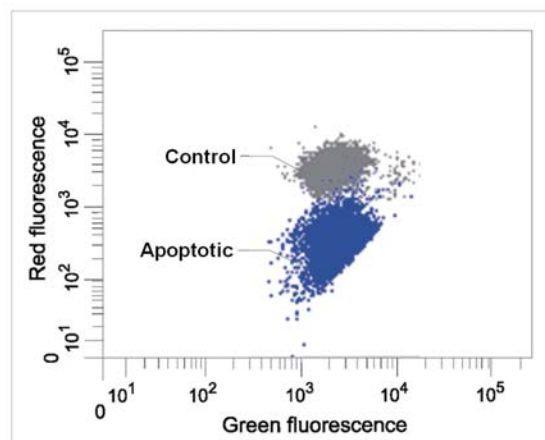


荧光参数：

Green : Ex= 485 nm ,Em= 525-545 nm

Red : Ex= 535 nm ,Em=585-605 nm

图4. 用荧光酶标仪, 通过荧光强度的红/绿比, 检测Jurkat细胞的线粒体膜电位 (Staurosporine诱导凋亡)



荧光参数：

Green : Ex=488 nm ,Em= 515-545 nm

Red : Ex=488 nm ,Em=564-604 nm

图5. 通过流式细胞仪分析 Jurkat细胞的线粒体膜电位变化 (Staurosporine诱导凋亡)

## 参考文献

- 1) Ferri, K. F. *et al.*, *Journal of Experimental Medicine*, **2000**, *192*, 1081–1092.
- 2) Matsuda, N. *et al.*, *Journal of Cell Biology*, **2010**, *189*, 211.
- 3) Wang, J. L. *et al.*, *PNAS*, **2000**, *97*, 7124–7129.

## 关联产品

### 细胞凋亡检测试剂盒

Annexin V, FITC Apoptosis Detection Kit (AD10)

Annexin V, 633 Apoptosis Detection Kit (AD11)

### 线粒体钙离子检测荧光探针

Rhod 2-AM (R002)

### 细胞质基质钙离子检测荧光探针

Fluo 3-AM (F026)

Fluo 4-AM (F312)

### 氧化应激类 · 超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒

SOD Assay Kit - WST (S311)

### 氧化应激类 · 氧化/还原型谷胱甘肽检测试剂盒 (GSSG/GSH) 检测试剂盒

GSSG/GSH Quantification Kit II (G263)

### 细胞周期检测试剂盒

Cell Cycle Assay Kit-PI/RNase Staining (C543)

### 细胞衰老检测试剂盒

Cellular Senescence Detection Kit-SPiDER- $\beta$ Gal (SG03)

### 细胞增殖毒性检测试剂盒

Cell Counting Kit-8 (CK04)

### 细胞毒性检测试剂盒

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (CK12)

### 活死细胞双染试剂盒

Calcein-AM/PI Double Staining Kit (C542)



如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

网址：<http://www.dojindo.cn>

E-mail: [info@dojindo.cn](mailto:info@dojindo.cn)

上海

北京

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室

邮编：200030

邮编：100029

电话：400-823-9388

电话：010-8225-1765

2018年12月