

细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）

JC-1 Apoptosis Detection Kit

说明书修订日期：2014.07.11

Cat number: KGA601-KGA604

Store at -20℃ for 12 months

For Research Use Only

一、试剂盒说明

大量的研究表明线粒体与细胞凋亡密切相关，其中线粒体跨膜电位（ $\Delta\psi$ ）的破坏，被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件之一，它发生在细胞核凋亡特征（染色质浓缩、DNA断裂）出现之前，一旦线粒体跨膜电位崩溃，则细胞凋亡不可逆转。

本试剂盒采用JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide)一种阳离子脂质荧光染料作为检测线粒体跨膜电位指示剂。JC-1有单体和多聚体两种存在状态，在低浓度时以单体的形式存在，高浓度时以多聚体形式存在，两者的发射光谱不同，但均可在流式细胞仪绿色（FL-1）通道检测出绿色荧光，JC-1可透过正常细胞膜以单体状态聚集胞内，正常健康线粒体的膜电位（ $\Delta\psi$ ）具有极性，JC-1依赖于 $\Delta\psi$ 的极性被迅速摄入线粒体内，并因浓度增高而在线粒体内形成多聚体，多聚体发射光为红色荧光；可被流式细胞仪的红色（FL-2）通道检测到，而细胞发生凋亡时，线粒体跨膜电位被去极化，JC-1从线粒体内释放，红光强度减弱，以单体的形式存在于胞质内发绿色荧光。根据这一特征检测线粒体膜电位的变化。

本试剂盒可应用于细胞、组织或纯化的线粒体膜电位检测。

二、试剂盒组份

组份	KGA601 10 assays	KGA602 20 assays	KGA603 50 assays	KGA604 100 assays	储存条件
JC-1	10 μ L	20 μ L	50 μ L	100 μ L	-20℃,避光
10×Incubation Buffer	2mL	4mL	10mL	20mL	2-8℃

三、试剂盒以外自备仪器和试剂

流式细胞仪或荧光显微镜、高速离心机、CO₂培养箱、微量移液器

1.5ml Microtube、载玻片、盖玻片（荧光显微镜观察需用）、PBS、灭菌去离子水

四、使用注意事项

1. 微量试剂取用前请离心集液。
2. JC-1 避光保存及使用。
3. 细胞培养至汇合度 80-90%，收集细胞量在 1×10^6 /Test。
4. 对 PH 变化过于敏感的细胞建议用胎牛血清取代 Buffer 孵育染色及洗涤，或延长观测时间。
5. 流式细胞仪检测线粒体膜电位变化受到多种因素的影响，因诱导剂、细胞株类型，作用时间的不同而荧光强度比例都有不同，因此没有通用标准的补偿设门指南，因此每个试验需设阴性及阳性对照组进行荧光补偿及设门。
6. 组织需先制备单细胞悬液或提取纯化线粒体后方可进行检测，可选用凯基细胞悬液制备试剂盒（KGA829）或线粒体提取试剂盒（KGA827）。

五、操作方法

1. 用适当的方法诱导细胞凋亡，同时设立阴性对照组和阳性对照组【用适当的凋亡诱导剂（如星形孢菌素，staurosporine），诱导适当时间后经其它检测（如 AnnexinV 或 Caspase 3 活性）证实确有凋亡产生】，收集细胞；
2. 用 PBS 洗涤细胞二次（离心 2000rpm，5min）；
3. 取 100 μ L 1 \times Incubation Buffer 加 900 μ L 灭菌去离子水稀释成 1 \times Incubation Buffer，混匀并预热至 37 $^{\circ}$ C；
4. 吸取 500 μ L 1 \times Incubation Buffer，加入 1 μ L JC-1，涡旋混匀配成 JC-1 工作液；【因 JC-1 在水中的溶解度很小，所以可以通过离心的方法（10,000rpm，1min）去除不溶的颗粒，吸取离心后的上清使用，以消除干扰】
5. 取 500 μ L JC-1 工作液将细胞均匀悬浮，37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 的培养箱中孵育 15~20min；
6. 室温离心（2000rpm，5min）收集细胞，用 1 \times Incubation Buffer 洗两次；
7. 吸取 500 μ L 1 \times Incubation Buffer 重新悬浮细胞；
8. 荧光显微镜观察或流式细胞仪分析。

A. 荧光显微镜观察

1. 滴一滴上述细胞悬液于载玻片，盖上盖玻片，于荧光显微镜下观察；
2. 对于贴壁细胞来说，也可直接用盖玻片来培养细胞并诱导细胞凋亡；用 PBS 洗涤细胞两次；
3. 滴加 100 μ L JC-1 工作液，加盖玻片，37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 的培养箱中孵育 15~20min；1 \times Incubation Buffer 洗涤 1~2 遍；将盖玻片倒置于载玻片上，于荧光显微镜下观察：

正常细胞：双色滤光片观察则为：绿++ 红++（高绿高红），如在同一滤光片下观察则为黄绿色
凋亡细胞：双色滤光片观察则为：绿++ 红+（高绿低红），如在同一滤光片下观察则为绿色

B. 流式细胞仪分析

用流式细胞仪检测（Ex=488 nm; Em=530 nm）细胞凋亡的情况，绿色荧光通过 FITC 通道通常为 FL1 来检测；红色荧光通过 PI 通道通常为 FL2 来检测。

正常细胞{FL-1 亮, FL-2 亮; R1}，凋亡细胞 {FL-1 亮, FL-2 暗; R2}，设门的位置根据细胞种类、实验条件等不同而变化，试验需设未经处理的正常细胞为阴性对照组和阳性对照组，根据阴性和阳性对照组的双参数散点图来设定门的位置。

六、实验范例

用凋亡诱导剂诱导 P388 细胞凋亡，在 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 培养箱培养 4~6h，利用凯基细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）进行检测，通过流式细胞仪分析分析结果如下。

