



线粒体膜电位检测试剂盒说明书（简化版）

（G009-1 JC-1 法）

一、试剂盒简介：

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、试剂盒组成与配制：

组分	G009-1-1 10T	G009-1-2 20T	G009-1-3 50T
JC-1	10 μ l	20 μ l	50 μ l
10 $\times$ Incubation Buffer	2.0ml	4.0ml	10.0ml

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、操作步骤

- 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），收集不多于 1×10^6 的细胞；
- 3、取 100 μ l 10 $\times$ 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；
- 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；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。