

## JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

### JC-10 线粒体膜电位检测试剂盒

#### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	40752ES60	100 T
JC-10 线粒体膜电位荧光探针		

#### 产品描述

线粒体膜电位荧光探针 JC-10 是 JC-1 的升级产品，同样可用于检测线粒体膜电位的变化。因 JC-1 虽然在许多实验中被广泛应用，但是其水溶性很差，即使在 1  $\mu$ M 浓度的条件下，JC-1 也会在水的缓冲液中析出。而 JC-10 具有更好的水溶性，可以在某些需要高浓度染料的实验中替代 JC-1。虽然在一些细胞系中 JC-10 有着比 JC-1 更好的表现，不过，JC-10 的性能表现极具细胞依赖性特征。

正常细胞内，JC-10 选择性聚集在线粒体基质中形成可逆的红色荧光聚合物（ $E_x=540$  nm,  $E_m=590$  nm）；不健康的线粒体由于膜电位的下降或丧失，JC-10 由多聚体转变为单体形式存在于胞浆中，产生绿色荧光（ $E_x=490$  nm,  $E_m=525$  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。这两种颜色的变化可以用流式细胞仪上的标准滤光器检测到，绿色荧光可用 FL1 通道分析，红色荧光可用 FL2 通道分析。除了用于流式细胞术，也可以用于荧光成像和荧光酶标板检测平台。

本试剂盒中提供了阳性对照 CCCP，其能诱导线粒体膜电位下降。对于六孔板中的样品，本试剂盒共可以检测 100 个样品。

#### 产品组分

编号	组分	规格
40752-A	JC-10 (200 $\times$ )	100 $\mu$ L $\times$ 5
40752-B	CCCP (10 mM)	20 $\mu$ L
40752-C	JC-10 染色缓冲液 (5 $\times$ )	80 mL
40752-D	超纯水	90 mL

#### 运输与保存方法

冰袋 (wet ice) 运输。-20 $^{\circ}$ C 干燥避光保存，分装，以避免反复冻融，一年有效。超纯水和 JC-10 染色缓冲液 (5 $\times$ ) 也可 4 $^{\circ}$ C 保存。

#### 注意事项

- JC-10 (200 $\times$ ) 在 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
- 须把 JC-10 (200 $\times$ ) 用试剂盒提供的超纯水充分溶解混匀后才可加入 JC-10 染色缓冲液 (5 $\times$ )。不可先配制 JC-10 染色缓冲液 (1 $\times$ ) 再加入 JC-10 (200 $\times$ )，否则 JC-10 将很难充分溶解并会严重影响后续的检测使用。
- 使 JC-10 染色缓冲液 (1 $\times$ ) 保持 4 $^{\circ}$ C 左右，此时的洗涤效果较好。
- JC-10 探针装载完并洗涤后尽量在 30 分钟内完成后续检测过程。在检测前需冰浴保存。
- 请勿把 JC-10 染色缓冲液 (5 $\times$ ) 全部配制成 JC-10 染色缓冲液 (1 $\times$ )，本试剂盒使用过程中需直接使用 JC-10 染色缓冲液 (5 $\times$ )。
- 如果发现 JC-10 染色缓冲液 (5 $\times$ ) 中有沉淀，必须全部溶解后才能使用，为促进溶解可以在 37 $^{\circ}$ C 加热。

- 7) CCCP 为线粒体电子传递链抑制剂，有毒，请注意小心防护。
- 8) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用方法

### 1. JC-10 染色工作液的配置

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，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。

### 2. 阳性对照的设置

取出试剂盒中供的 CCCP (10 mM) 按照 1 : 1000 的比例加入到细胞培养液中，使其终浓度为 10 μM，处理细胞 20 分钟。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 分钟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决定。

### 3. 细胞染色

#### 3.1 对于悬浮细胞

- 1) 取  $1 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$  个细胞重悬于 0.5 mL 细胞培养液中 (可以含血清和酚红)，加入 0.5 mL JC-10 染色工作液，颠倒混匀。
- 2) 37°C 孵育 20 分钟。孵育期间，按每 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×)，并置于冰浴，作为洗液。
- 3) 37°C 孵育结束后，600g 4°C 离心 3~4 分钟，弃上清，注意尽量不要吸除细胞。加入 1 mL JC-10 染色缓冲液 (1×) 重悬细胞，600 g，4°C 离心 3~4 分钟，弃上清，重复一次。
- 4) 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。

#### 3.2 对于贴壁细胞

- 1) 对于 6 孔板，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 1 mL 细胞培养液 (可以含血清和酚红)。
- 2) 然后加入 1 mL JC-10 染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中 37°C 孵育 20 分钟。孵育期间，按每 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，作为洗液。
- 3) 37°C 孵育结束后，吸除上清，用 JC-10 染色缓冲液 (1×) 洗涤 2 次。
- 4) 加入 2 mL 细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

**【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。

#### 3.3 对于纯化的线粒体

- 1) 把配制好的 JC-10 染色工作液用 JC-10 染色缓冲液 (1×) 稀释 5 倍。取 5 倍稀释的 JC-10 染色工作液 0.9 mL 加入 0.1 mL 总蛋白量为 10~100 μg 纯化的线粒体。
- 2) 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 485nm 时，可以在 475~520nm 范围内设置激发波长。

## 4. 荧光观测

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 单体时可以参考观察其它绿色荧光时的设置，如观察 GFP 或 FITC 时的设置；检测 JC-10 聚合物时可以参考观察其它红色荧光，如碘化丙啶或 Cy3 时的设置。