

JC-1

1. 产品描述

JC-1 是一种阳离子羰花青荧光染料，广泛用于检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential)。JC-1 染料带正电荷，能够以电势依赖性的方式积聚在带负电的线粒体内部，可以用来检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位。JC-1 有单体和多聚体两种存在状态，低浓度时，以单体存在，可检测到绿色荧光；高浓度时，以多聚体存在，可检测到红色荧光。对于正常细胞，膜电位正常时，JC-1 进入线粒体并聚集在线粒体基质中形成聚合物，产生红色荧光 (Ex/585 nm, Em/590 nm)；对于凋亡细胞，线粒体膜电位下降或丧失，JC-1 不能聚集在线粒体的基质中，只能以单体的形式存在于胞浆中，产生绿色荧光 (Ex/514 nm, Em/529 nm)。

荧光发射由绿色 (~529 nm) 转变为红色 (~590 nm)，表明 JC-1 染料积累在线粒体中并呈电位依赖性特征。红色/绿色荧光强度比例降低代表线粒体去极化。因此，JC-1 染料的最常见应用是检测细胞凋亡中的线粒体去极化。可通过荧光技术进行分析，如流式细胞术和荧光成像。

JC-1 用于检测细胞的线粒体膜电位时常用的浓度范围为 1-20 μ g/ml，对于很多细胞适宜采用的 JC-1 浓度为 10 μ g/ml。

2. 产品信息

货号	产品名称	规格
A3516	JC-1	1mg/5mg/10mg/50mg/200mg

3. 使用方法

(1) 工作液配制

1) 储存液配制：JC-1 以粉末形式提供，产品开盖前需要经过瞬时离心，如果产品是从冰箱中取出则需要先置于室温进行回温。直接将 1 mL DMSO 加到 JC-1 粉末 (5 mg) 内，室温颠倒混匀使其充分溶解，即得到浓度为 5 mg/mL 的储存液。储存液配置的浓度可以根据实验需求进行调整。使用者需要根据单次用量将溶液分装成小量储存于 -20°C，避光干燥，避免反复冻融。

2) 工作液配制：将冻存的储存液置于室温充分融化和回温，之后用缓冲液或者预热的培养基直接稀释储存液 (5 mg/mL) 到需要的工作液浓度，边震荡边稀释，充分混匀。为了去除任何不溶颗粒，建议 13,000 x g 离心 JC-1 工作液 1 min，小心吸取上清转移到新的管子内。整个过程要避光操作。注意：因 JC-1 不溶于水，很可能在稀释到工作液的过程中析出形成聚集颗粒，则建议细胞染色前用离心或者过滤的方法去除这些颗粒后再使用。

(2) JC-1 染色步骤 (流式细胞仪)

1) 制备细胞悬液 (密度为 5×10^5 cells/mL)，在 6-、12 或 24-孔板上进行细胞铺板。置于 37°C，5% CO₂ 细胞培养箱中培养过夜。选择合适的化合物根据特定的步骤进行凋亡诱导。注：进行凋亡诱导时的细胞密度建议不超过 1×10^6 cells/mL，也可根据自己的细胞类型培养

至合适的密度。

- 2) 取 0.5 mL 细胞悬液至无菌的离心管内。
- 3) 室温条件 400 x g 离心 5 min; 弃上清。
- 4) 用 0.5 mL JC-1 工作液重悬细胞, 于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱孵育 15-30 min; 注意: 一般情况, 15 min 足以进行充分的染色。【注意】: 实验过程中控制好总体稀释倍数, DMSO 在培养液中的浓度不能超过 0.1%, 以避免 DMSO 对细胞的影响。
- 5) 室温条件 400 x g 离心 5 min; 弃上清;
- 6) 用 2 mL 细胞培养液或者缓冲液重悬细胞, 之后室温条件 400 x g 离心 5 min; 弃上清;
- 7) 重复步骤 6);
- 8) 用 0.5 mL 新鲜细胞培养液或者缓冲液重悬细胞, 即可进行后续的流式分析。注意: 请马上进行流式定量分析。

数据分析: 含有红色 JC-1 聚集物的健康细胞线粒体用 FL2 通道检测; 含有绿色 JC-1 单体的凋亡或不健康细胞用 FL1 (FITC) 通道检测。

(3) JC-1 染色步骤 (荧光显微镜)

A. 悬浮细胞

- 1) -6) 同上 “JC-1 染色步骤 (流式细胞仪)”;
- 7) 用 0.3 mL 的缓冲液重悬细胞, 即可进行荧光显微镜检测。注意: 请马上进行荧光显微分析。**数据分析:** 使用可同时检测荧光素 fluorescein/罗丹明或者荧光素 fluorescein/Texas RedTM 的双带带通滤波器进行检测。未凋亡的活细胞因 JC-1 聚集后线粒体呈红色, 最大发射波长为 590 nm。凋亡和坏死细胞染料一直以单体形式存在, 线粒体呈现绿色。最大发射波长为 529 nm。

B. 贴壁细胞

- 1) 培养皿内用盖玻片进行细胞爬片或者细胞培养在腔室玻片 (chamber slide) 上。选择合适的化合物根据特定的步骤进行凋亡诱导。
- 2) 染色前开始配制 JC-1 工作液, 配制步骤见上。
- 3) 吸掉细胞培养液, 然后加入足够覆盖所有细胞的 JC-1 工作液。于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱孵育 15-30 min; 注意: 一般情况, 15 min 足以进行充分的染色。
- 4) 吸掉培养液, 然后用合适的缓冲液来清洗细胞 2 次。
- 5) 加入 2 mL 细胞培养液 (培养液可含有血清和酚红) 或者 PBS 缓冲液, 于荧光显微镜或者共聚焦显微镜下观察。数据分析同 “A. 悬浮细胞”。

(4) JC-1 染色步骤 (荧光酶标仪)

- 1) -7) 同上 “JC-1 染色步骤 (流式细胞仪)”;
- 8) 用 300 μ L 缓冲液重悬细胞; 然后按照每孔 100 μ L 的量将染色好的细胞转移到黑色的 96 孔板内, 即可进行荧光酶标仪分析。注意: 请马上进行荧光显微分析。

数据分析: 健康细胞内, JC-1 单体聚集形成聚合物, 线粒体呈现强烈的红色荧光 (激发波长 550 nm, 发射波长 600 nm)。凋亡或坏死细胞内 JC-1 以单体形式存在, 线粒体呈强烈的绿色荧光 (激发波长 485 nm, 发射波长 535 nm)。然后计算红色荧光信号与绿色荧光信号的比值, 用来判断细胞健康程度。