



## Oriscience JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒)

### 产品信息

货号	名称	规格
CB203-25 T	Oriscience JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (JC-1线粒体膜电位检测试剂盒)	25 T
CB203-50 T	Oriscience JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (JC-1线粒体膜电位检测试剂盒)	50 T
CB203-100 T	Oriscience JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (JC-1线粒体膜电位检测试剂盒)	100 T

### 产品简介

本试剂盒以 JC-1 为特异性荧光探针，可快速、灵敏检测细胞及纯化线粒体的膜电位( $\Delta\Psi_m$ )变化，是细胞早期凋亡检测的专用试剂盒，操作简便、检测灵敏度高、实验重复性好。

JC-1 作为线粒体膜电位检测的理想探针，其荧光特性随线粒体膜电位水平呈电势依赖性改变：在线粒体膜电位较高时，JC-1 聚集于线粒体基质形成聚合物(J-aggregates)，产生红色荧光；当线粒体膜电位降低时，JC-1 无法聚集，以单体(monomer)形式存在于胞浆，产生绿色荧光。可通过荧光颜色的直观转变定性判断线粒体膜电位变化，亦可通过红绿荧光强度的相对比例，精准定量衡量线粒体的去极化程度。线粒体膜电位下降是细胞凋亡早期的标志性事件，本试剂盒可通过 JC-1 红、绿荧光的转换，高效实现细胞早期凋亡的快速检测；同时配套提供 FCCP（碳酰氰-4-三氟甲氧基苯肼）——线粒体电子传递链专用解偶联剂，作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照，为实验结果的准确性提供可靠参考。

### 产品组成

名称	Oriscience JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (JC-1线粒体膜电位检测试剂盒)			
	CB203-25 T	CB203-50 T	CB203-100 T	储存条件
JC-1(200×)	125 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	-20°C避光
JC-1染色缓冲液(5×)	20 mL	40 mL	80 mL	-20°C或4°C保存
FCCP(10 mM)	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L	-20°C
超纯水	30 mL	50 mL	100 mL	4°C

### 储存条件

冰袋运输，-20°C避光保存，尽量避免反复冻融，有效期 1 年。超纯水和 JC-1 染色缓冲液(5×)也可 4°C 保存。

### 注意事项

- JC-1(200×)在 4°C、冰浴等低温条件下易凝固，粘于离心管管底/管壁/管盖，使用前可在 20~25°C 水浴温育片刻，至完全融解后再稀释，融解后轻轻混匀。
- FCCP 为线粒体电子传递链抑制剂，具有毒性且易挥发，操作时需在通风橱内进行；穿实验服、戴一次性手套和口罩，避免直接接触皮肤、吸入或误食；若不慎接触，立即用大量清水冲洗接触部位。
- 所有染色步骤均需避光，避免荧光淬灭；JC-1 染色工作液需现配现用，配制后 1 h 内完成染色。

4. 用 1×染色缓冲液洗涤细胞时，需保持缓冲液在 4°C 左右（冰浴），可提高洗涤效果，减少非特异性染色；洗涤操作动作轻柔，避免细胞脱壁（贴壁细胞）或破裂（悬浮细胞）。
5. JC-1 探针装载并洗涤后，需在 30 min 内完成所有荧光检测，检测前样品置于冰浴保存，避免线粒体膜电位发生人为改变，影响结果准确性。
6. 请勿将 JC-1 染色缓冲液(5×)全部配制成 1×缓冲液，本试剂盒中染色工作液的配制需直接使用 5×原液。
7. 本试剂盒组分均为科研专用试剂，不可用于人体或动物活体实验，试剂盒开封后请在有效期内使用。

## 使用说明

**试剂平衡与预处理：**将试剂盒中 JC-1 (200×) 和 FCCP (10 mM) 从 -20°C 取出，冰上完全融解，轻轻混匀；超纯水、JC-1 染色缓冲液 (5×) 按需取出，所有操作注意避光。

### 1. JC-1 染色工作液的配制

配制原则：现配现用，避免久置。六孔板每孔需 1 mL 染色工作液，其它孔板所需量以此类推；细胞悬液每 50~100 万细胞需 0.5 mL 染色工作液。（以配制 10 mL JC-1 染色工作液为例）

- (1) 取 50  $\mu$ L JC-1(200×)，加入 8 mL 试剂盒配套超纯水。
- (2) 涡旋振荡器剧烈震荡 1~2 min，使 JC-1 充分溶解混匀，无沉淀/絮状物。
- (3) 加入 2 mL JC-1 染色缓冲液(5×)，轻轻颠倒混匀，即为 JC-1 染色工作液，配制后置于室温避光备用。

*OriNote: 必须先将 JC-1(200×)用超纯水溶解, 再加入染色缓冲液(5×), 不可先配 1×染色缓冲液再稀释 JC-1, 否则会导致 JC-1 溶解不完全, 严重影响检测结果。*

### 2. 阳性对照的设置 (FCCP 处理)

- (1) 取试剂盒中的 FCCP (10 mM)，在无菌条件下按 1:1000 比例加入预热至 37°C 的新鲜无双抗无血清的细胞培养基中，轻柔混匀，稀释至终浓度 10  $\mu$ M。

*OriNote: ①FCCP 易挥发, 稀释操作需快速完成, 稀释后 1h 内使用。②FCCP 为高效线粒体解偶联剂, 常规浓度即可快速降低线粒体膜电位, 对于特定的细胞, FCCP 的作用浓度和时间可能有所不同, 请参考文献。可优化浓度(10~50  $\mu$ M, 即 1:200~1:1000 稀释)和作用时间(20~40 min)。*

- (2) 吸除六孔板中细胞的原有培养液，加入 2 mL 含 10  $\mu$ M FCCP 的新鲜培养液，37°C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中处理 20~30 min。
- (3) 后续按悬浮/贴壁细胞操作步骤进行 JC-1 染色及检测。

### 3. 样品染色

#### (1) 悬浮细胞检测步骤

- a. 收集 10~60 万对数生长期悬浮细胞，转移至无菌离心管，用 0.5 mL 细胞培养液重悬。
- b. 加入 0.5 mL JC-1 染色工作液，轻轻颠倒数次混匀，避免产生气泡，全程避光。
- c. 37°C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育 20 min。
- d. 孵育期间配制 1×染色缓冲液：按 1 mL 5×染色缓冲液中加入 4 mL 无菌蒸馏水的比例配制，配制后置于冰浴中备用。
- e. 孵育结束后，600×g、4°C 低温离心 3~4 min，轻轻弃去上清，注意保留少量上清避免吸除细胞沉淀。
- f. 用 1 mL 冰浴的 1×染色缓冲液重悬细胞，600×g、4°C 离心 3~4 min，弃上清，重复洗涤 2 次。

g. 用适量(100~500  $\mu$ L)冰浴的 1 $\times$ 染色缓冲液重悬细胞沉淀，立即进行荧光检测。

**(2) 贴壁细胞检测步骤（适用于荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪）**

*OriNote:* 对于贴壁细胞，如果希望采用荧光酶标仪或流式细胞仪检测，先消化收集细胞，再重悬后参考悬浮细胞的检测方法进行染色。

- 吸除 6 孔板中细胞的培养液，若细胞表面有杂质，用 PBS 轻轻洗涤 1 次，弃去 PBS。
- 加入 1 mL JC-1 染色工作液，轻轻晃动培养板混匀，全程避光。
- 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育 20 min。
- 孵育期间配制 1 $\times$ 染色缓冲液（同悬浮细胞，冰浴备用）。
- 孵育结束后，弃上清，用冰浴 1 $\times$ 染色缓冲液洗涤细胞 2 次，洗涤后缓慢弃去缓冲液，避免细胞脱壁。
- 每孔加入 2 mL 细胞培养液或 1 $\times$ 染色缓冲液，立即置于荧光显微镜 / 激光共聚焦显微镜下观察。

**(3) 纯化线粒体检测步骤**

- 把配制好的 JC-1 染色工作液再用 1 $\times$ 染色缓冲液稀释 5 倍。
- 取 0.9 mL 配制好的 JC-1 染色工作液，加入 0.1 mL 纯化的线粒体悬液（总蛋白量 10~100  $\mu$ g），轻轻混匀，全程避光。
- 检测分析：荧光显微镜/共聚焦显微镜：直接滴加样本至载玻片，加盖玻片后观察荧光信号。荧光分光光度计/酶标仪检测：直接进行时间扫描，激发波长 485 nm，发射波长 590 nm；若酶标仪无法设置 485 nm，可在 475~520 nm 范围内调整激发波长。

**4. 荧光观测**

(1) 波长设置参考：

JC-1 单体（绿色荧光）：激发光 490 nm，发射光 530 nm（可使用观察 FITC 或 GFP 的滤光片）。

JC-1 聚合物（红色荧光）：激发光 525 nm，发射光 590 nm（可使用观察 PI 或 Cy3 的滤光片）。

(2) 结果判读：

正常细胞线粒体膜电位正常，呈现鲜红色荧光，绿色荧光信号微弱或无。凋亡早期细胞线粒体膜电位下降，呈现绿色荧光，红色荧光信号显著减弱或消失。

*OriNote:* 红色荧光信号淬灭快于绿色荧光，显微镜观察时建议先拍红色荧光，后拍绿色荧光。

**数据展示**

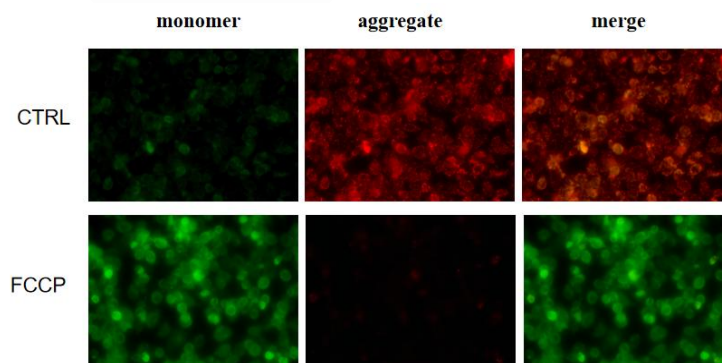


图 1 JC-1 染色检测 FCCP 处理后 HeLa 细胞线粒体膜电位变化

## 常见问题及解决方法

Q1: JC-1 试剂溶解不完全出现沉淀怎么办?

- 低温导致 JC-1 凝固, 需将 JC-1 (200×) 在 20~25°C 水浴温育片刻至完全融解后再稀释。
- 配制顺序错误, 需先将 JC-1 (200×) 用超纯水剧烈震荡溶解, 再加入 JC-1 染色缓冲液 (5×), 不可先配 1× 缓冲液。
- 试剂反复冻融失效, 需避免 JC-1 试剂反复冻融, 使用新鲜的试剂盒组分。

Q2: 视野中背景荧光过高、信号模糊怎么办?

- 洗涤不充分, 需用 4°C 冰浴的 JC-1 染色缓冲液 (1×) 多洗涤 1 次, 离心操作规范避免细胞碎片残留。
- JC-1 工作液配制后久置, 需现配现用 JC-1 染色工作液, 配制后立即进行染色操作。
- 细胞培养状态差, 需使用对数生长期的细胞, 避免细胞过度融合或自然凋亡。

Q3: 红绿荧光比值变化不明显怎么办?

- 凋亡诱导不充分, 需优化诱导剂浓度和作用时间, 延长细胞处理时长。
- 检测参数未优化, 确保红色通道未饱和、绿色通道灵敏度足够, 调整设备曝光参数。
- 试剂可能失效, 需使用新鲜配制的 JC-1 工作液和 FCCP 阳性对照试剂。

Q4: FCCP 阳性对照未出现绿色荧光怎么办?

- FCCP 浓度过低或作用时间不足, 可提高 FCCP 浓度至 20~50  $\mu\text{M}$  或延长作用时间至 30~40 分钟。
- FCCP 试剂失效/挥发, 需检查 FCCP 保存条件 (-20°C 避光密封), 使用新鲜稀释的 FCCP 溶液, 稀释操作快速完成。
- 细胞对 FCCP 不敏感, 需参考相关文献优化阳性对照处理条件, 适当提高 FCCP 作用浓度。

Q5: 荧光信号淬灭速度过快怎么办?

- 检测时间过长, JC-1 探针洗涤后需在 30 分钟内完成所有荧光检测, 减少样品暴露时间。
- 未避光操作, 所有染色、洗涤和检测步骤均需全程避光, 样品检测前冰浴保存。
- 荧光检测设备参数不当, 可适当提高检测增益, 优先检测红色荧光并快速拍照。

Q6: 贴壁细胞染色后脱壁严重怎么办?

- 洗涤操作过于剧烈, 吸除上清和加入缓冲液时动作轻柔, 避免直接冲击细胞层。
- 细胞贴壁性差, 可提前使用多聚赖氨酸包被培养板, 增强细胞贴壁能力。
- 离心操作导致细胞脱落, 贴壁细胞直接原位洗涤, 无需离心处理。

Q7: 悬浮细胞离心后易丢失、沉淀不完整怎么办?

- 离心转速或时间不足, 需严格按照 600×g、4°C 离心 3~4 分钟, 避免转速过低或离心时间过短。
- 弃上清时操作不当, 弃上清时保留少量上清液, 避免吸除细胞沉淀, 重悬时轻轻吹打。
- 细胞浓度过低, 可适当提高离心的细胞数量, 确保细胞沉淀量充足。



相关产品

货号	名称	规格
CB104-50 T	Oriscience Annexin V-Alexa Fluor 488/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	50 T
CB105-50 T	Oriscience Annexin V-Alexa Fluor 647/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒)	50 T
CB106-50 T	Oriscience Annexin V-FITC/7-AAD Apoptosis Detection Kit (Annexin V-FITC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒)	50 T
CB202-1 mg	Oriscience JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Fluorescent Probe (JC-1线粒体膜电位荧光探针)	1 mg
CB204-1 mg	Oriscience JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Fluorescent Probe (JC-10 线粒体膜电位荧光探针)	1 mg
CB205-50 T	Oriscience JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (JC-10 线粒体膜电位检测试剂盒)	50 T
CB206-5 mg	Oriscience Rhodamine 123 (罗丹明 123)	5 mg
CB207-50 T	Oriscience Rhodamine 123 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (罗丹明 123 线粒体膜电位检测试剂盒)	50 T

**Oriscience Biotechnology Co., Ltd.**

www.oriscience.com

Tel: 400-158-2128

Emails: order@oriscience.com

technical\_support@oriscience.com

