

JC-1 - мембранный потенциал митохондрий

Артикулы Servicebio: G1515-100T

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО / ПОДГОТОВКА И РАБОЧИЕ УСЛОВИЯ

Что подготовить

Подготовьте живые клетки, систему регистрации зелёной и красной флуоресценции, необходимые буферы и контроль деполяризации. Проверьте, можно ли на вашем приборе сохранить одинаковые настройки каналов для всей серии. До окрашивания распределите образцы по очередности измерения, чтобы задержка между подготовкой и регистрацией не различалась произвольно.

ОСНОВНЫЕ УСЛОВИЯ ПО ИНСТРУКЦИИ SERVICEBIO

Для какой задачи

Оценка изменений потенциала митохондрий в живых клетках. При высоком потенциале преобладает красная флуоресценция агрегатов JC-1; при снижении усиливается зелёный сигнал мономеров.

Подготовка раствора

Сначала смешайте 2 мкл JC-1 (500×) с 900 мкл разбавителя, затем внесите 100 мкл буфера (10×). Последовательность важна для растворения красителя. Промывочный буфер готовят отдельно разведением 10× буфера водой до 1×.

Адгезивные клетки

Для 6-луночного планшета: после промывки внесите 1 мл среды и 1 мл рабочего раствора JC-1. Инкубируйте в CO₂-инкубаторе 15-30 мин в темноте; дважды промойте 1× буфером. Для наблюдения добавьте 2 мл буфера либо среды, желательно без фенолового красного.

Контроль результата

В наборе предусмотрен СССР для контроля деполяризации. Условия его воздействия могут требовать оптимизации. Экспозицию красного и зелёного каналов задают по контрольным клеткам и сохраняют для опытных групп. После окрашивания рекомендуется завершить измерение за 30 мин.

Хранение

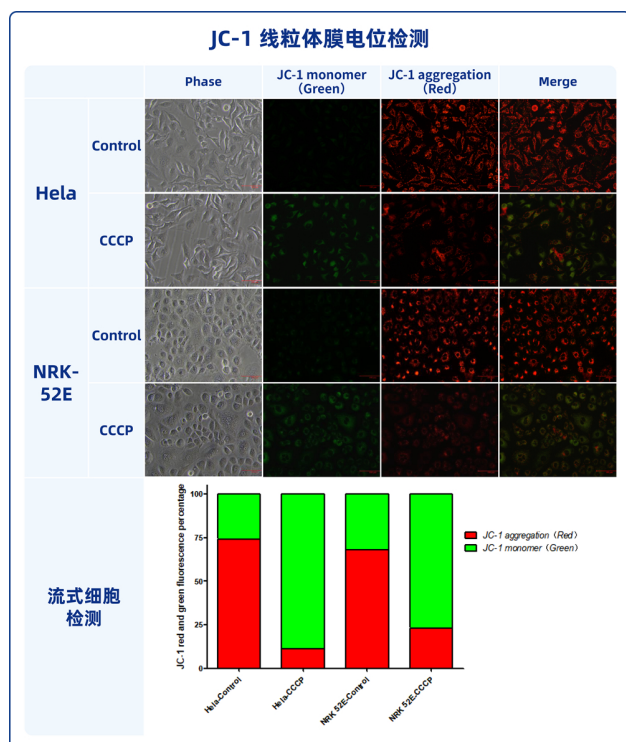
Концентрат JC-1: -20 °C, сухое хранение, защита от света и повторного замораживания. Буфер и разбавитель допускают 4 °C. Срок - 12 месяцев.

Как спланировать постановку • рекомендации Молекулаб

В рабочем листе заранее определите измеряемую величину: например, отношение красного сигнала к зелёному после учёта фона. Зафиксируйте направление отношения, чтобы не поменять смысл результата. Предлагаем анализировать опытную группу вместе с необработанными клетками и контролем деполяризации. Набор и состояние клеток должны быть сопоставимы внутри серии.

Результат и контроль качества

Пояснения к методу и практические рекомендации Молекулаб



Servicebio: контроль и CCCP; зелёный канал - мономеры, красный - агрегаты JC-1. Merge - совмещение каналов.

Что означает результат

При деполяризации обычно уменьшается отношение красной флуоресценции к зелёной. Это характеристика мембранного потенциала, а не прямое измерение количества АТФ или активности отдельного фермента. По одному JC-1 нельзя установить причину изменения. Для заключения о клеточной гибели целесообразно сопоставить результат с отдельным показателем жизнеспособности.

Какие контроли нужны

В контрольной пробе с деполяризацией ожидается сдвиг в сторону зелёного сигнала. Если его нет, сначала проверьте пригодность постановки и регистрации. При микроскопии сравнивайте одинаково обработанные каналы; автоматическая экспозиция для каждой фотографии может скрыть или преувеличить различия.

Если результат вызывает вопросы

Оба канала слабые	Проверьте окрашивание, состояние клеток и настройки регистрации.
Есть яркие внеклеточные точки	Проверьте растворение красителя; не включайте осадок в клеточный сигнал.
Результат зависит от порядка съёмки	Сопоставьте задержку после окрашивания и условия нахождения образцов.

Что сохранить в лабораторном журнале

Записывайте настройки обоих каналов, способ вычитания фона и формулу отношения. Не обозначайте результат как абсолютное значение потенциала в милливольт без отдельной калибровки.