

线粒体膜电位检测试剂盒(Rhodamine 123)

Cat NO: IMFP-C001

产品简介

线粒体膜电位检测试剂盒(Rhodamine 123) (Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit with Rhodamine 123)是一种以 Rhodamine 123 为荧光探针对线粒体进行染色并进行膜电位检测的试剂盒。本试剂盒可用于活细胞线粒体膜电位的检测，也用于细胞凋亡的检测。本试剂盒可使用荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测设备进行检测。

Rhodamine 123 也称 2-(6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid methyl ester，中文名为罗丹明 123，分子式为 C₂₁H₁₇ClN₂O₃，分子量为 380.82，CAS 号为 62669-70-9。Rhodamine 123 是一种通透细胞膜的黄绿色阳离子荧光探针，最大激发光波长为 507nm，最大发射光波长为 529nm。Rhodamine 123 的化学结构式和激发、发射光谱图参考图 1。

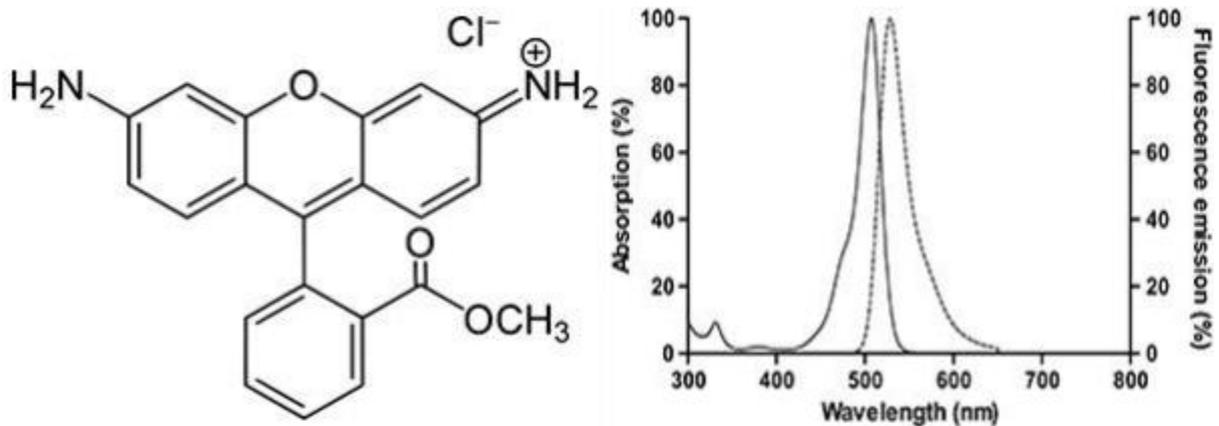


图 1. Rhodamine 123 的化学结构式和激发、发射光谱图。

本试剂盒检测线粒体膜电位的原理如下。在正常细胞中，Rhodamine 123 能够依赖线粒体跨膜电位(mitochondrial transmembrane potential, $\Delta \Psi_m$)选择性进入线粒体基质，可发出明亮的黄绿色荧光；当细胞发生凋亡或坏死时，线粒体膜电位丢失，线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)持续开放，引起线粒体跨膜电位($\Delta \Psi_m$)的崩溃，Rhodamine 123 从线粒体中释放出来，从而导致线粒体内黄绿色荧光强度的明显降低。此外有报道，在个别特定情况下，Rhodamine 123 探针在线粒体内过度聚集后可能会出现自

发淬灭(self-quenching)现象，线粒体内黄绿色荧光强度降低，而在凋亡发生时，线粒体中黄绿色荧光增强。使用本产品，按照说明中推荐的实验条件，对于实际测试过的细胞仅观察到了凋亡或坏死时 Rhodamine 123 的荧光染色减弱或消失的现象。本产品染色后，可用荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等仪器检测细胞，通过荧光信号的强弱来确定线粒体膜电位的变化和凋亡或坏死的发生。

Rhodamine 123可以快速通过细胞膜，仅需几分钟就可以被具有活性的线粒体所捕获(sequestered by active mitochondria)，并且对细胞没有明显毒性。

本试剂盒可以应用于大多数的哺乳动物细胞及酵母。由于 Rhodamine 123在线粒体内的积累依赖于线粒体膜电位，因此本试剂盒仅限用于存活的细胞或组织的检测，不可用于固定或冻存的细胞或组织的检测。

本试剂盒提供的 Rhodamine 123 为 1000X 溶液，该溶液经过优化，对大多数细胞都适用。但为了得到满意的结果，对于不同类型的细胞请自行进行一定摸索。Rhodamine 123 的终浓度一般为0.1X-5X，最优先的推荐终浓度为 1X，染色时间通常为 20~60 分钟。试剂盒提供的 CCCP 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照，终浓度一般为 1-20 μM ，最优先的推荐终浓度为 10 μM 。同时，本试剂盒提供了检测缓冲液，该缓冲液可在一段时间内维持细胞的正常状态，并给细胞提供一定的营养，效果比 PBS 或 HBSS 更好。

6孔板每孔检测体系的体积为 1ml 时可以检测 20-100 次，96孔板每孔检测体系的体积为 100 μl 时可以检测 1000 次。

产品信息

表 1.产品信息

产品名称	产品规格	储存条件	保质期
线粒体膜电位检测试剂(Rhodamine 123)	20T/50T/100T	-20℃	12 个月

产品组成

表 1.组成信息

产品名称	20T	50T	100T
Rhodamine 123 (1000X)	20 μ L	50 μ L	100 μ L
染色缓冲液	20mL	50mL	100mL
CCCP (10mM)	5 μ L	10 μ L	20mL

使用说明

1. Rhodamine 123 染色工作液的配制:

6孔板每孔所需 Rhodamine 123 染色工作液的量为 1ml，其它培养器皿的 Rhodamine 123 染色工作液的用量以此类推；对于细胞悬液每 50-100 万细胞需 0.5ml Rhodamine 123 染色工作液。取适量 Rhodamine 123 (1000X)，按照每 1 μ l Rhodamine 123 (1000X)加入 1ml 检测缓冲液的比例稀释 Rhodamine 123，混匀后即为 Rhodamine 123 染色工作液。

注 1：配制 Rhodamine 123 染色工作液时注意避光，且须现配现用，不能长期保存。

注 2：本试剂盒中提供的检测缓冲液含有 Ca²⁺，能够在一段时间内维持细胞的正常状态，并给细胞提供一定的营养，效果比 PBS 或 HBSS 更好；检测缓冲液也可用细胞培养液代替，但培养液中不能含有血清，否则会影响 Rhodamine 123 的染色效果。

注 3：染色工作液中 Rhodamine 123 的最终浓度需根据不同细胞系和实验体系通过预实验进行优化。Rhodamine 123 的推荐工作浓度为 1X，可以在 0.1X-5X 范围内摸索最佳工作浓度。

2. 阳性对照的设置:

把试剂盒中提供的 CCCP (10mM) 推荐按照 1:1000 的比例加入到细胞培养液中，稀释至 10 μ M，处理细胞 20 分钟。随后按照下述方法加入 Rhodamine 123 染色工作液，进行线粒体膜电位的检测。对于大多数细胞，通常 10 μ M CCCP 处理 20 分钟后线粒体的膜电位会完全丧失，Rhodamine 123 染色后观察应呈弱黄绿色或几乎无荧光；而正常的细胞经 Rhodamine 123 染色后应显示明亮的黄绿色荧光。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或自行摸索确定。

3. 对于悬浮细胞:

a. 细胞按照实验设计进行一定处理后，计数。取适量细胞 600 \times g 室温离心 5min，弃上清，加入适当体积的 Rhodamine 123 染色工作液重悬细胞，使细胞密度约为 1 \times 10⁶/ml。

b.细胞培养箱中 37℃ 孵育 20-60min，不同的细胞最佳孵育时间不同。以 20min 作为初始孵育时间，对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

c.37℃ 孵育结束后，600×g 室温离心 5min，沉淀细胞。吸除上清，注意尽量不要触及细胞。

d.用 37℃ 预热的细胞培养液洗涤 2 次：加入 1ml 37℃ 预热的细胞培养液重悬细胞，600×g 离心 5 分钟，沉淀细胞，弃上清；再加入 1ml 37℃ 预热的细胞培养液重悬细胞，600×g 离心 5 分钟，沉淀细胞，弃上清。

e.再用适量细胞培养液重悬后，用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察，也可以用荧光酶标仪或流式细胞仪分析。

4.对于贴壁细胞：

注意：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，可以先收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。荧光酶标仪如果能采用底读的方式进行荧光检测，也可以使用96孔板等进行贴壁培养检测的。

a.对于 6 孔板的一个孔的细胞，吸除培养液，根据具体实验如有必要可以用 PBS 或其它适当溶液洗涤细胞一次。

b.加入 1ml Rhodamine 123 染色工作液。细胞培养箱中 37℃ 孵育 20-60min，不同的细胞最佳孵育时间不同。以 20min 作为初始孵育时间，对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

c.37℃ 孵育结束后，吸除上清，用预热的细胞培养液洗涤 2 次。

d.加入 2ml 预热的细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。

e.荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

5.对于纯化的线粒体：

a.准备好 Rhodamine 123 染色工作液。

b.0.9ml Rhodamine 123 染色工作液中加入 0.1ml 总蛋白量为 10-100μg 纯化的线粒体。

c.用荧光酶标仪或荧光分光光度计检测：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 507nm，发射波长为 529nm。如果使用荧光酶标仪，可在软件中把检测对象设置为 FITC，即可以检测 Rhodamine 123。另外，也可以参考下面步骤 6 中的波长设置进行荧光检测。

d.用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察：方法同下面的步骤6。

6.荧光观测和结果分析：

Rhodamine 123 的最大激发波长为 507nm，最大发射波长为 529nm。如使用荧光显微镜观察，可以参考观察 FITC 等其它绿色荧光时的设置。黄绿色荧光变弱说明线粒体膜电位下降，并且该细胞很可能处于细胞凋亡早期。通过对比实验组与阴性对照组测量的 Relative fluorescence values (RFU)，可以得出药物处理后线粒体内 Rhodamine 123 探针荧光强度的变化。此处的阴性对照为仅含检测缓冲液的未经染色的细胞样品。

注：流式检测应获得两个相对独立的细胞群：明亮绿色荧光的正常细胞群和弱绿色荧光的凋亡或坏死细胞群。

注意事项

- 1、本试剂盒仅限于用于存活的细胞或组织的检测，不可用于固定或冻存的细胞或组织样品的检测。
- 2、检测缓冲液经过过滤除菌处理，在使用时须注意避免微生物污染，否则很可能严重影响染色效果。如果检测缓冲液发生浑浊等明显的微生物污染，就不能继续使用。
- 3、CCCP 为线粒体电子传递链抑制剂，对人体有害，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 4、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
- 5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 6、荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。