

Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (Rhodamine 123)

线粒体膜电位检测试剂盒 (Rhodamine 123)

产品编号	产品名称	规格
BL778A	线粒体膜电位检测试剂盒 (Rhodamine 123)	100-1000T

产品简介:

线粒体膜电位检测试剂盒 (Rhodamine 123) 是一种以 Rhodamine 123 为荧光探针快速灵敏地检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位变化的试剂盒, 也可以用于细胞凋亡检测。其原理是在正常细胞中, Rhodamine 123 能够依赖线粒体跨膜电位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持续开放, 引起线粒体跨膜电位的崩溃, 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。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 最大激发光波长为 507nm, 最大发射光波长为 529nm。本试剂盒提供 CCCP 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。

如果用于流式细胞仪, 每个样品的检测体系体积为 0.5mL 时, 可以进行 200 次检测; 6 孔板每孔检测体系的体积为 1mL 时可以检测 100 次, 96 孔板每孔检测体系的体积为 100uL 时可以检测 1000 次。

产品组成:

组分	规格
Rhodamine 123 (1000×)	100uL
染色缓冲液	100mL
CCCP (10mM)	20uL

使用方法:

一、Rhodamine 123 染色工作液的配制

取适量 Rhodamine 123 (1000×), 按照每 1uL Rhodamine 123 (1000×) 加入 1mL 检测缓冲液的比例稀释, 充分混匀后即为 Rhodamine 123 染色工作液。

注: 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; 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; Rhodamine 123 的推荐工作浓度为 1X, 可根据不同细胞和实验体系通过预实验在 0.1X-5X 范围内摸索最佳工作浓度。

二、阳性对照的设置:

将 CCCP(10mM)与细胞培养液按照 1:1000 的比例混合稀释至 10μM, 处理细胞 20 分钟。对于大多数细胞, 通常 10μM 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荧光或几乎无荧光; 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。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



三、对于悬浮细胞

1. 细胞按照实验设计进行一定处理后，计数。取适量细胞 600×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 1×10⁶/mL。
2. 细胞培养箱中 37°C 孵育 20-60 分钟。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。
3. 37°C 孵育结束后，600g 室温离心 5 分钟沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸出细胞。
4. 用 37°C 预热的细胞培养液洗涤 2 次；加入 1mL 37°C 预热的细胞培养液重悬细胞，600g 离心 5 分钟，沉淀细胞，弃上清；重复一次。
5. 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，也可以用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

四、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以用 PBS 或其它适当溶液洗涤细胞一次。
2. 加入 1mL Rhodamine 123 染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中 37°C 孵育 20-60 分钟。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。
3. 37°C 孵育结束后，吸除上清，用 37°C 预热的细胞培养液洗涤 2 次。
4. 加入 2mL 37°C 预热的细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。
5. 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。对于贴壁细胞，如果用荧光分光光度计或流式细胞仪检测，先收集细胞，重悬后参考步骤三。

五、对于纯化的线粒体

1. 取 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。
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，激发波长为 507nm，发射波长 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六中的波长设置进行荧光检测。
3. 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察：参考步骤六。

六、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。

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、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。
- 2、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。
- 3、检测缓冲液已过滤除菌处理，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。
- 4、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。
- 5、荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑色板或白板，更建议使用 96 孔黑色板。





- 6、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，不得存放于普通住宅内。
- 7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：

-20°C避光保存，尽量避免反复冻融，有效期一年。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

电话：400-600-4213

邮箱：techserv@labgic.com

