

使用说明书

Instruction Manual

线粒体膜电位检测试剂盒 (TMRE)

Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (TMRE)

产品描述

TargetMol 线粒体膜电位检测试剂盒 (TMRE) 是一种以 TMRE 为荧光探针, 专用于快速检测线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 动态变化的试剂盒。线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 指线粒体内膜两侧的电位差, 其形成与维持对线粒体的能量代谢、物质运输及细胞生存至关重要, 是反映线粒体功能的重要指标。

四甲基罗丹明乙酯 (Tetramethylrhodamine Ethyl Ester, TMRE) 是一种膜渗透性的阳离子型橘红色荧光染料, 其化学结构含四甲基罗丹明母核与乙酯基团, 亲脂性乙酯基团使其能自由穿透细胞膜。TMRE 检测线粒体膜电位变化的原理为: 当线粒体膜电位正常时, TMRE 通过膜电位驱动进入线粒体基质, 质子化后聚集并发出橘红色荧光 (激发波长 549 nm, 发射波长 574 nm); 当膜电位去极化时, 荧光强度显著降低。因此, 通过检测荧光强度变化能反映线粒体功能状态, 可用于早期细胞凋亡检测。

本试剂盒适用范围广泛, 兼容细胞、组织及纯化线粒体等多种样本类型, 并且能适配荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光分光光度计及流式细胞仪等多种检测仪器。

产品信息

产品编号	产品名称	浓度	溶剂	规格
C0175-1	TMRE	20 mM	DMSO	100 μ L
C0175-2	CCCP	10 mM	DMSO	100 μ L

产品特点

1. 特异性强, 背景信号少。
2. 适用性广, 能用于多种样本类型。
3. 细胞毒性低。
4. 荧光信号稳定
5. 操作简便。

产品应用

凋亡早期线粒体膜电位检测、线粒体靶向药物开发、线粒体功能与代谢疾病研究、衰老细胞线粒体功能衰退研究。

工作液配制

用适宜稀释液 (无血清培养基或 PBS) 将储备液稀释成浓度为 1-20 μ M 的工作液。

本试剂盒若用于 6 孔板, 工作液浓度为 20 μ M, 每孔检测体积为 1 mL, 则可检测 100 次; 若用于 96 孔板, 工作液浓度为 20 μ M, 每孔检测体积为 100 μ L, 则可检测 1000 次。

使用说明

1. 对照组设置：

(1) 阳性对照组（CCCP 组）：CCCP 是一种常用的解偶联剂，其作为质子载体可携带质子穿过线粒体内膜，消除膜两侧的质子浓度差，线粒体膜电位依赖于质子梯度的维持，CCCP 的作用会导致线粒体膜电位迅速下降。CCCP 能诱导线粒体膜电位丧失，在线粒体膜电位检测实验中常被用作阳性对照。

具体步骤为：用无血清培养基将 CCCP 储备液（10 mM）稀释成浓度为 10 μ M 的 CCCP 工作液。吸除旧培养基，向细胞加入 CCCP 工作液，处理 20-30 min。然后按下述对悬浮细胞或贴壁细胞进行 TMRE 染色的步骤，加入适量 TMRE 工作液，进行线粒体膜电位检测。10 μ M CCCP 处理 20-30 min 几乎能诱导大多数细胞的线粒体膜电位丧失，经 TMRE 染色后观察到弱红色荧光或几乎无荧光；线粒体膜电位正常的细胞经 TMRE 染色后可观察到明亮的红色荧光。

(2) 阴性对照组（溶剂对照组）：不进行药物处理或其他干预，排除药物本身或实验操作导致的非特异性荧光干扰。

(3) 空白对照组：细胞不用药物处理，也不经 TMRE 染色，用于检测自发荧光或背景信号。

2. 悬浮细胞线粒体膜电位检测：

(1) 将细胞悬液以 600 $\times$ g 室温离心 5 min，弃上清。加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 PBS 重悬细胞，以 600 $\times$ g 室温离心 5 min，弃上清，收集细胞沉淀。

(2) 加入适量 TMRE 染色工作液重悬细胞，调整细胞密度为 5×10^5 - 1×10^6 cells/mL，将细胞转移至 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱避光孵育 15-50 min。

(3) 孵育结束后，以 600 $\times$ g 室温离心 5 min，弃上清。

(4) 加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 PBS 重悬细胞，600 $\times$ g 室温离心 5 min，弃上清。重复洗涤 1 次。

(5) 加入适量 37 $^{\circ}$ C 预热的细胞培养基重悬细胞，然后在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察染色情况，也可用流式细胞仪或荧光分光光度计检测染色结果。Ex=550 nm，Em=575 nm 左右。测定荧光时无需将激发光与发射光波长严格限定在最大波长处，可参考其他红色荧光探针（如 Rhodamine）的激发光/发射光波长设置。

3. 贴壁细胞线粒体膜电位检测：

(1) 将细胞接种在无菌爬片上培养，待培养完成后吸除培养液，用 37 $^{\circ}$ C 预热的 PBS 洗涤细胞一次。

(2) 加入适量 TMRE 染色工作液，将细胞转移至 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱 15-50 min。

(3) 吸除染色液，用 37 $^{\circ}$ C 预热的 PBS 洗涤细胞 2 次。

(4) 加入 37 $^{\circ}$ C 预热的细胞培养基覆盖住细胞，在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察染色结果。Ex=550 nm，Em=575 nm 左右。测定荧光时无需将激发光与发射光波长严格限定在最大波长处，可参考其他红色荧光探针（如 Rhodamine）的激发光/发射光波长设置。

注：若需要用流式细胞仪或荧光分光光度计检测贴壁细胞，可先用胰蛋白酶对贴壁细胞进行消化，收集、重悬细胞后参照上述悬浮细胞的操作步骤进行线粒体膜电位检测。

储存条件

-20 $^{\circ}$ C 避光保存，一年有效。

注意事项

1. 由于样本类型和实验环境的不同均会影响染色效率，建议通过预实验来优化 TMRE 工作液浓度和染色时间。
2. CCCP 的最佳工作浓度和处理时间也可能因为样本不同而有差异，可通过预实验调整最佳条件，建议工作浓度范围是 1-20 μ M。
3. TMRE 荧光探针适用于活细胞的线粒体膜电位检测，而不适用于固定细胞线或固定组织的线粒体膜电位检测。
4. TMRE 属于荧光染料，光照易导致荧光淬灭，操作过程应注意避光。
5. 本品仅适用于专业科研用途，严禁用于临床诊断、治疗、食品或药品领域，且不得存放于住宅等非专业场所。
6. 为保障操作安全与人员健康，操作时请务必穿戴实验服并佩戴一次性手套。

