

# 使用说明书

Instruction Manual

TargetMol  
YOUR TARGET MOLECULES

## 线粒体膜电位检测试剂盒 (Rhodamine 123)

### Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (Rhodamine 123)

#### 产品描述

TargetMol 线粒体膜电位检测试剂盒 (Rhodamine 123) 是一种以 Rhodamine 123 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。

罗丹明 123 (Rhodamine 123) 是一种带正电荷的脂溶性荧光染料, 可自由穿过细胞膜进入细胞质, 其在胞质中呈游离状态, 发出的荧光微弱。在正常生理状态下, 线粒体通过电子传递链维持内膜两侧的电化学梯度 (内膜内侧为负、外侧为正), 带正电荷的 Rhodamine 123 受电化学梯度驱动经内膜孔道进入线粒体基质, 并与基质中的蛋白质或脂质结合, 发出明亮的绿色荧光 (最大激发波长 507 nm, 最大发射波长 529 nm)。而当细胞凋亡、氧化应激或药物损伤等导致线粒体膜电位去极化时, 电化学梯度减弱, 染料从线粒体释放至胞质, 荧光强度随之减弱。通过检测荧光强度的变化即可反映线粒体膜电位状态, 从而用于细胞凋亡检测。

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
C0176-1	Rhodamine 123	20 mM	DMSO	100 $\mu$ L
C0176-2	CCCP	10 mM	DMSO	100 $\mu$ L

#### 产品特点

- 灵敏度高。
- 对照体系完善。
- 细胞毒性低。
- 探针稳定性好。
- 适用性广, 能用于多种样本类型。

#### 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  $\mu$ M 的工作液。

本试剂盒若用于 6 孔板, 工作液浓度为 20  $\mu$ 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  $\mu$ M, 每孔检测体积为 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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 Rhodamine 123 染色的步骤, 加入适量 Rhodamine 123 工作液, 进行线粒体膜电位检测。10  $\mu$ 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 Rhodamine 123 染色后观察到微弱绿色荧光或几乎无荧光; 线粒体膜电位正常的细胞经 Rhodamine 123 染色后可观察到明亮的绿色荧光。

(2) 阴性对照组 (溶剂对照组): 细胞不进行药物处理或其他干预, 进行 Rhodamine 123 染色, 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 Rhodamine 123 染色, 用于检测自发荧光或背景信号。

### 2. 对于悬浮细胞:

(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 Rhodamine 123 染色工作液重悬细胞, 调整细胞密度为 5 $\times$ 10<sup>5</sup>-1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL, 将细胞转移至 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中避光孵育 20-60 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, 以 600 $\times$ g、室温离心 5 min, 弃上清。重复此步骤 1 次。

(5) 加入适量 37 $^{\circ}$ C 预热的细胞培养基重悬细胞, 在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察染色情况, 也可以用流式细胞仪或荧光分光光度计检测染色结果。Ex=507 nm, Em=529 nm 左右。

### 3. 对于贴壁细胞:

(1) 吸除培养液, 加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 PBS 洗涤细胞 1 次。

(2) 加入适量 Rhodamine 123 染色工作液, 将细胞转移至 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中避光孵育 20-60 min。

(3) 孵育结束后, 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。Ex=507 nm, Em=529 nm 左右。

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 Rhodamine 123 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  $\mu$ M。
3. Rhodamine 123 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或固定组织的线粒体膜电位检测。
4. Rhodamine 123 属于荧光染料, 光照易导致荧光淬灭, 操作过程应注意避光, 染色工作液建议现配现用。
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。

