

**线粒体膜电位检测试剂盒 (Rhodamine 123)****产品包装:**

产品编号	产品名称	包装	保存温度
DW0011-A	Rhodamine 123 (1000X)	100ul	-20°C,避光
DW0011-B	染色缓存液	100ml	-20°C
DW0011-C	CCCP (10mM)	20ul	-20°C

自备试剂及耗材:

吸头/离心管。

实验步骤:**1. Rhodamine 123 染色工作液的配制:**

a. 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。

b. 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°C 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°C 孵育结束后, 600 \times 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°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, 离心 5 分钟, 沉淀细胞, 弃上清; 重复一次。

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°C 孵育 20-60min, 不同的细胞最佳孵育时间



多沃生物

Dowobio Biotechnology Co., Ltd



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°C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 10-100 μ g 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. 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。
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板或白板，建议使用 96 孔黑板。
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。

本产品文章中的写法：

英文：Dowobio (Shanghai, China)

中文：上海多沃生物科技有限公司 Dowobio, 上海