

## 线粒体膜电位检测试剂盒(TMRE)

| 产品编号   | 产品名称              | 包装        |
|--------|-------------------|-----------|
| C2001S | 线粒体膜电位检测试剂盒(TMRE) | 100-1000次 |

### 产品简介:

- 碧云天的线粒体膜电位检测试剂盒(TMRE) (Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit with TMRE)是一种以TMRE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,可以用于早期的细胞凋亡检测。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系统进行检测。
- TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester), 中文名称叫做四甲基罗丹明乙酯, CAS号为115532-52-0, 分子式为 $C_{26}H_{27}ClN_2O_7$ , 分子量为515。TMRE是一种可渗透细胞膜的橘红色阳离子荧光探针,可在完整的线粒体中聚集,而去极化或非活性线粒体膜电位降低,导致TMRE积聚减少。检测时TMRE的最大激发波长为550nm,最大发射波长为575nm。TMRE的化学结构式和激发、发射光谱图参考图1。

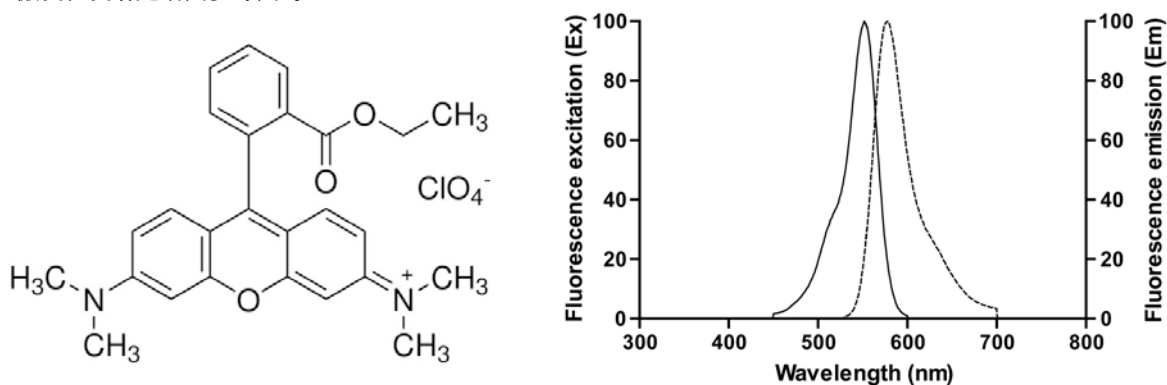


图1. TMRE的化学结构式和激发、发射光谱图。

- 本试剂盒检测线粒体膜电位的原理如下。正常状态下的线粒体内部存在大量的负电荷,作为阳离子探针的TMRE进入细胞内后可聚集在线粒体基质中,可发出明亮的橘红色荧光;当细胞发生凋亡时,线粒体膜电位丢失,线粒体通透性转换孔(MPTP)持续开放, TMRE被释放到细胞质中,线粒体内橘红色荧光强度明显下降。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。
- 本试剂盒可以应用于大多数的哺乳动物细胞,有报道称TMRE也可以用于某些酵母如*Saccharomyces cerevisiae*。由于TMRE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TMRE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, TMRE的终浓度一般为0.1X-5X,最优先的推荐终浓度为1X。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 $\mu$ M,最优先的推荐终浓度为10 $\mu$ M。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。
- 本试剂盒提供的TMRE探针在线粒体内的荧光强度随线粒体膜电位的变化非常敏感,较低的浓度就可以产生明亮的荧光,并且背景清晰,非常适合用于凋亡实验中高通量检测线粒体膜电位的变化。使用本试剂盒检测NRK-52E细胞线粒体膜电位变化的效果参考图2。

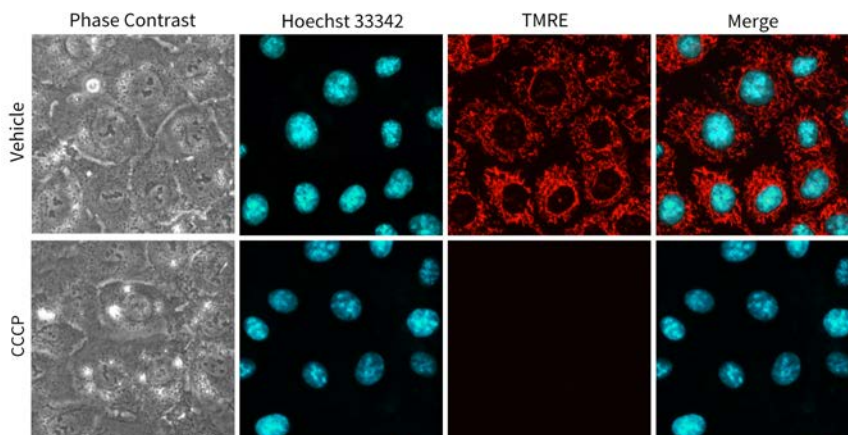


图2. 使用线粒体膜电位检测试剂盒(TMRE)的检测效果图。正常的NRK-52E中, TMRE在线粒体内聚集发出明亮的橘红色荧光; 使用CCCP诱导使线粒体膜电位下降后, 线粒体内橘红色荧光强度明显下降, 几乎完全消失。

- 碧云天各种线粒体膜电位检测试剂盒的比较和选择, 请参考:  
<https://www.beyotime.com/support/MitochondrialMembrane.htm>。
- 本试剂盒小包装C2001S, 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100μl时可以检测1000次。

包装清单:

| 产品编号     | 产品名称         | 包装    |
|----------|--------------|-------|
| C2001S-1 | TMRE (1000X) | 100μl |
| C2001S-2 | 检测缓冲液        | 100ml |
| C2001S-3 | CCCP (10mM)  | 20μl  |
| —        | 说明书          | 1份    |

保存条件:

-20℃保存, 一年有效。其中TMRE (1000X)需要-20℃避光保存。

注意事项:

- 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。
- 本试剂盒仅限于进行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。
- 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。
- 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。
- 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(碧云天的FCP966 BeyoGold™全黑96孔细胞培养板)。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. TMRE染色工作液的配制:

6孔板每孔所需TMRE染色工作液的量为1ml, 其它培养器皿的TMRE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 TMRE染色工作液。取适量TMRE (1000X), 按照每1μl TMRE (1000X)加入1ml检测缓冲液的比例稀释TMRE, 混匀后即为TMRE染色工作液。

注1: 配制TMRE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Ca<sup>2+</sup>, 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TMRE的染色效果。

注3: 染色工作液中TMRE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。TMRE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10μM, 处理细胞20分钟。随后按照下述方法加入TMRE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10μM CCCP处理20分钟后线粒体的膜电位会完全丧失, TMRE染色后观察应呈弱红色或几乎无荧光; 而正常的细胞经TMRE染色后应显示明亮的红色荧光。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×g室温离心5min, 弃上清, 加入适当体积的TMRE染色工作液重悬细胞, 使细胞密度约为1×10<sup>6</sup>/ml。
- b. 细胞培养箱中37℃孵育15-45min, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以15min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 TMRE染色工作液。细胞培养箱中37℃孵育15-45min, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以15min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TMRE染色工作液。
  - b. 0.9ml TMRE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550nm，发射波长为575nm。如果使用荧光酶标仪，可在软件中把检测对象设置为Rhodamine或Texas Red，即可以检测TMRE。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：**

TMRE的最大激发波长为550nm，最大发射波长为575nm。**注意：**此处测定荧光时不必把激发光和发射光波长设置在最大激发波长和最大发射波长。如使用荧光显微镜观察，可以参考观察Rhodamine或Texas Red等其它红色荧光探针时的设置。红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TMRE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。

**相关产品：**

| 产品编号              | 产品名称                              | 包装              |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------|
| C1002             | DAPI                              | 5mg/ml×0.2ml    |
| C1005/C1006       | DAPI染色液                           | 10ml/50ml       |
| C1011             | Hoechst 33258                     | 10mg            |
| C1017/C1018       | Hoechst 33258染色液                  | 10ml/50ml       |
| C1022             | Hoechst 33342                     | 10mg            |
| C1025/C1026       | Hoechst 33342染色液                  | 10ml/50ml       |
| C1027/C1028/C1029 | Hoechst 33342活细胞染色液(100X)         | 0.1ml/0.5ml/3ml |
| C1031             | CFDA SE (细胞增殖示踪荧光探针)              | 5mg             |
| C1033             | Actin-Tracker Green (微丝绿色荧光探针)    | 0.2ml           |
| C1036             | DiI (细胞膜红色荧光探针)                   | 10mg            |
| C1038             | DiO (细胞膜绿色荧光探针)                   | 10mg            |
| C1041             | ER-Tracker Red (内质网红色荧光探针)        | 20μl            |
| C1043             | Golgi-Tracker Red (高尔基体红色荧光探针)    | 1mg             |
| C1046             | Lyso-Tracker Red (溶酶体红色荧光探针)      | 50μl            |
| C1048             | Mito-Tracker Green (线粒体绿色荧光探针)    | 50μg            |
| C1050             | Tubulin-Tracker Red (抗体法微管红色荧光探针) | 40μl            |
| C2001S            | 线粒体膜电位检测试剂盒(TMRE)                 | 100-1000次       |
| C2003S            | 增强型线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)              | >100次           |
| C2005             | JC-1                              | 1mg             |
| C2006             | 线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)                 | >100次           |
| C2007             | Rhodamine 123                     | 5mg             |
| S0019             | DAF-FM DA (NO荧光探针)                | >100次           |
| S0063             | Dihydroethidium (超氧化物阴离子荧光探针)     | 5mg             |
| S1006             | BCECF AM (pH荧光探针, 5mM)            | 50微升            |
| S1052             | Fura-2 AM (钙离子荧光探针, 2mM)          | 50微升            |
| S1056             | Fluo-3 AM (钙离子荧光探针, 5mM)          | 20微升            |
| S1060             | Fluo-4 AM (钙离子荧光探针, 2mM)          | 25微升            |
| S1082             | MQAE (氯离子荧光探针)                    | 20mg            |

**使用本产品的文献：**

1. Xue-Chun Ni, Hong-Fei Wang, Yuan-Yuan Cai, Dai Yang, Raphael N Alolga, Baolin Liu, Jia Li, Feng-Qing Huang. Ginsenoside Rb1 inhibits astrocyte activation and promotes transfer of astrocytic mitochondria to neurons against ischemic stroke. Redox Biol. 2022 Aug;54:102363.
2. Jie Zhang, Xuejie Han, Jing Chang, Jian Liu, Yingming Liu, Hongxia Wang, Fenghe Du, Xiangjun Zeng, Caixia Guo. Soluble RAGE attenuates myocardial I/R injuries via FoxO3-Bnip3 pathway. Cell Mol Life Sci. 2022 May 2;79(5):269.
3. Kexia Fan, Xiao Ding, Zhenle Zang, Yin Zhang, Xiaoshuang Tang, Xiangdong Pei, Qingbo Chen, Huachun Yin, Xin Zheng, Yong Chen, Song Li, Hui Yang. Drp1-Mediated Mitochondrial Metabolic Dysfunction Inhibits the Tumor Growth of Pituitary Adenomas. Oxid Med Cell Longev. 2022 Mar

23:2022:5652586.

4. Hengli Zhao, Gaopeng Xian, Jingxin Zeng, Guoheng Zhong, Dongqi An, You Peng, Dongtu Hu, Yingwen Lin, Juncong Li, Shuwen Su, Yunshan Ning, Dingli Xu, Qingchun Zeng. Hesperetin, a Promising Dietary Supplement for Preventing the Development of Calcific Aortic Valve Disease. *Antioxidants* (Basel). 2022 Oct 24;11(11):2093
5. Minghui Li, Wei Lu, Yuanyuan Meng, Wenjie Zhang, Fengge Wang, Li Sun, Yuekang Xu. Tetrahydroxy Stilbene Glucoside Alleviates Ischemic Stroke by Regulating Conformation-Dependent Intracellular Distribution of PKM2 for M2 Macrophage Polarization. *J Agric Food Chem*. 2022 Dec 14;70(49):15449-15463.
6. Qing Tu, Yi Li, Jiali Zhu, Long Guo, Chenchen Liu, Lu Liu, Yuan Yuan, Yun Zou, Feng Chen, Liangfang Yao, Jinbao Li. Mitochondrial DNA mediates immunoparalysis of dendritic cells in sepsis via STING signalling. *Cell Prolif*. 2022 Dec;55(12):e13328.
7. Haoyang Li, Jieying Guan, Jiaqian Chen, Weimin Sun, Honglv Chen, Yuhuan Wen, Qile Chen, Shiyun Xie, Xueyan Zhang, Ailin Tao, Jie Yan. Necroptosis signaling and NLRP3 inflammasome cross-talking in epithelium facilitate *Pseudomonas aeruginosa* mediated lung injury. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2023 Mar;1869(3):166613.

Version 2024.03.12