Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору для определения митохондриального мембранного потенциала с помощью TMRE

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору для определения
митохондриального мембранного потенциала с помощью TMRE 3-8

RU

Инструкция к набору для определения митохондриального мембранного потенциала с помощью TMRE

TMRE Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit — готовый к использованию набор, предназначенный для измерения изменений митохондриального мембранного потенциала в живых клетках с помощью TMRE на микропланшетах, а также методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.

LumiTracker® Mito TMRE — проникающий в клетки положительно заряженный красно-оранжевый краситель, который избирательно накапливается в активных митохондриях благодаря их отрицательному мембранному потенциалу. Когда митохондрии становятся неактивными или деполяризованными, их мембранный потенциал снижается, что препятствует удержанию TMRE и приводит к снижению сигнала флуоресценции.

Помимо красителя, набор содержит FCCP — митохондриальный разобщитель, который обычно используется в качестве положительного контроля деполяризации митохондрий или апоптоза.

Состав набора

Компонент набора	Количество 45372 200 assays
B9410, FCCP, митохондриальный разобщитель, 10 uL, 50 mM/DMSO	1
B3615, LumiTracker® Mito TMRE, 40 uL, 1 mM/DMSO	1

Транспортировка: при комнатной температуре в течение 1 недели. Хранить при -20°C.

Срок хранения 12 месяцев.

Прежде чем начать

- Один анализ (assay), указанный в спецификации набора, соответствует одной лунке планшета.
- Компоненты набора предоставлены с запасным объемом с учетом дополнительных разведений, испарения или требований разных приборов.
- TMRE требует интактных митохондрий с сохраненным мембранным потенциалом и не подходит для окрашивания изолированных органелл.
- TMRE окрашивает только живые митохондрии, и не подходит для работы с фиксированными клетками.
- Защищайте растворы TMRE и окрашенные клетки от света, чтобы предотвратить фотообесцвечивание.

RU

Приготовление реагентов

- Перед открытием все небольшие флаконы следует кратковременно центрифугировать.
- Избегайте вспенивания при смешивании и растворении реагентов.

1. Рабочий раствор TMRE

- Разделите стоковый раствор TMRE на аликвоты, чтобы предотвратить повторные циклы замораживания-оттаивания. Храните аликвоты при -20°C в защищенном от света месте.
- Приготовьте красящий рабочий раствор TMRE в два этапа. Сначала разбавьте 1 мМ стоковый раствор в культуральной среде до 10–20-кратного промежуточного раствора и уже затем этот раствор доводите до необходимой рабочей концентрации. Например, для получения 1 мкМ TMRE в 10 мл среды сначала приготовьте 1 мл 10 мкМ TMRE (10 мкл 1 мМ TMRE плюс 990 мкл среды), и только затем добавьте этот раствор к 9 мл культуральной среды.
- Оптимальная рабочая концентрация TMRE зависит от клеточной линии и должна быть определена эмпирически. Типичные начальные диапазоны концентраций:
    - Анализ в микропланшетах: 200–1000 нМ
    - Проточная цитометрия: 50–400 нМ
    - Микроскопия: 50–200 нМ

2. Рабочий раствор FCCP

- Разделите 50 мМ стоковый раствор FCCP на аликвоты и храните при -20°C в защищенном от света месте.
- Разбавьте стоковый раствор FCCP в культуральной среде до конечной концентрации 20 мкМ. Например, для приготовления 10 мл рабочего раствора необходимо разбавить 4 мкл стокового раствора в культуральной среде.

Процедура анализа

- Обрабатывайте все образцы и контроли в двух повторах.
- Включайте в эксперимент контроли с обработкой FCCP (деполяризация мембран, низкий сигнал) и неокрашенными клетками для вычета фона.
- Держите планшеты плотно закрытыми во время инкубации.
- Меняйте наконечники пипеток между образцами, стандартами и реагентами для предотвращения перекрестного загрязнения.

1. Подготовка клеток

- *Обработка клеток:* Культивируйте и обработайте клетки в соответствии с дизайном вашего эксперимента. Время обработки варьируется в зависимости от экспериментальных условий. Разобщители, такие как FCCP, действуют в течение нескольких минут, тогда как непрямое воздействие может потребовать более длительной инкубации.
- *Контроль с FCCP:* Обработайте клетки 20 мкМ FCCP в течение 10 минут перед окрашиванием TMRE для снижения митохондриального мембранного потенциала.

2. Анализ в микропланшете (суспензионные клетки)

1. Приготовьте клетки из расчета 1–2×10^5 клеток в 100–200 мкл среды на одну лунку. Плотность оптимизируется для конкретной клеточной линии.
2. Добавьте TMRE, используя промежуточный 10–20-кратный раствор в соответствующей культуральной среде (рекомендуемая рабочая концентрация 200–1000 нМ). Инкубируйте 15–30 минут при 37°C.
3. Аккуратно центрифугируйте клетки при 300 *g* в течение 4 минут и аспирируйте среду, не нарушая клеточный осадок.
4. Ресуспендируйте в том же объеме PBS/0,2% BSA и снова центрифугируйте.
5. Ресуспендируйте в PBS/0,2% BSA.

6. Перенесите в планшет и измерьте флуоресценцию (Ex/Em ~552/575 нм).

3. Анализ в микропланшете (адгезивные клетки)

1. Посейте клетки в микропланшет с оптимальной плотностью (субконфлюэнтный монослой) и дайте им прикрепиться.
2. Добавьте TMRE, используя промежуточный 10–20-кратный раствор в соответствующей культуральной среде (рекомендуемая рабочая концентрация 200–1000 нМ). Инкубируйте 15–30 минут при 37°C.
3. Аспирируйте среду и дважды промойте PBS/0,2% BSA.
4. Немедленно измерьте флуоресценцию (Ex/Em ~552/575 нм; рекомендуется измерение по дну планшета).

4. Проточная цитометрия

1. Используйте приблизительно 1×10^5 клеток на образец. Поддерживайте концентрацию суспензионных клеток ниже 1×10^6/мл, а адгезивных клеток — в субконфлюентном состоянии.
2. Добавьте TMRE, используя промежуточный 10–20-кратный раствор в соответствующей культуральной среде (рекомендуемая рабочая концентрация 50–400 нМ). Инкубируйте 15–30 минут при 37°C.

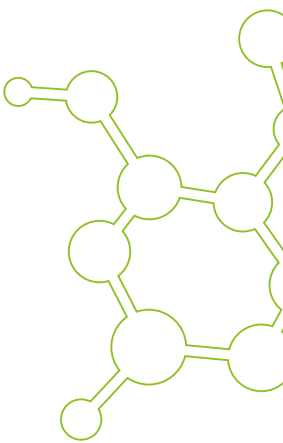
   Опционально. Удаление культуральной среды не является обязательным для проточной цитометрии, однако, промывка раствором PBS/0,2% BSA позволяет уменьшить фоновый сигнал.
3. Приготовьте суспензию клеток. При необходимости обработайте адгезивные клетки трипсином.
4. Проанализируйте с помощью лазера с длиной волны 488 нм и детектируйте излучение на длине волны ~575 нм (например, канал FL2).

5. Микроскопия (визуализация живых клеток)

Важно! Визуализацию необходимо производить непосредственно после окрашивания для поддержания физиологических условий.

1. Культивируйте клетки подходящим для вашей системы визуализации образом.
2. Добавьте TMRE, используя промежуточный 10–20-кратный раствор в соответствующей культуральной среде (рекомендуемая концентрация 50–200 нМ; используйте минимальную концентрацию, обеспечивающую насыщение сигнала). Инкубируйте в течение 15–30 минут при 37°C.
3. Аккуратно замените среду предварительно подогретым раствором PBS. Повторите при необходимости для уменьшения фонового сигнала.
4. Немедленно проведите визуализацию, используя соответствующий набор флуоресцентных фильтров (Ex/Em ~552/575 нм).

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com