

Инструкция к набору для определения  
митохондриального мембранныго  
потенциала с помощью TMRE

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

## Contents

Русский: Инструкция к набору для определения

митохондриального мембранныго потенциала с помощью TMRE ..... 3-8

# 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 мембранныму 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 — ингибитор АТФ-азы, который обычно используется в качестве положительного контроля деполяризации митохондрий или апоптоза.

## Состав набора

Компонент набора	Количество
	<b>45372</b>
	<b>200 assays</b>

B9410, FCCP, ингибитор АТФазы, 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.

# 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 аликовты, чтобы предотвратить повторные циклы замораживания-оттаивания. Храните аликовты 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 аликовты 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 мембранныго потенциала.

## 2. Анализ в микропланшете (сuspensionные клетки)

1. Приготовьте клетки из расчета  $1-2 \times 10^5$  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 ( $\text{Ex}/\text{Em} \sim 552/575$  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 ( $\text{Ex}/\text{Em} \sim 552/575$  нм; рекомендуется измерение по дну планшета).

### **4. Проточная цитометрия**

1. Используйте приблизительно  $1 \times 10^5$  клеток на образец. Поддерживайте концентрацию суспензионных клеток ниже  $1 \times 10^6/\text{мл}$ , а адгезивных клеток — в субконфлюэнтном 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.

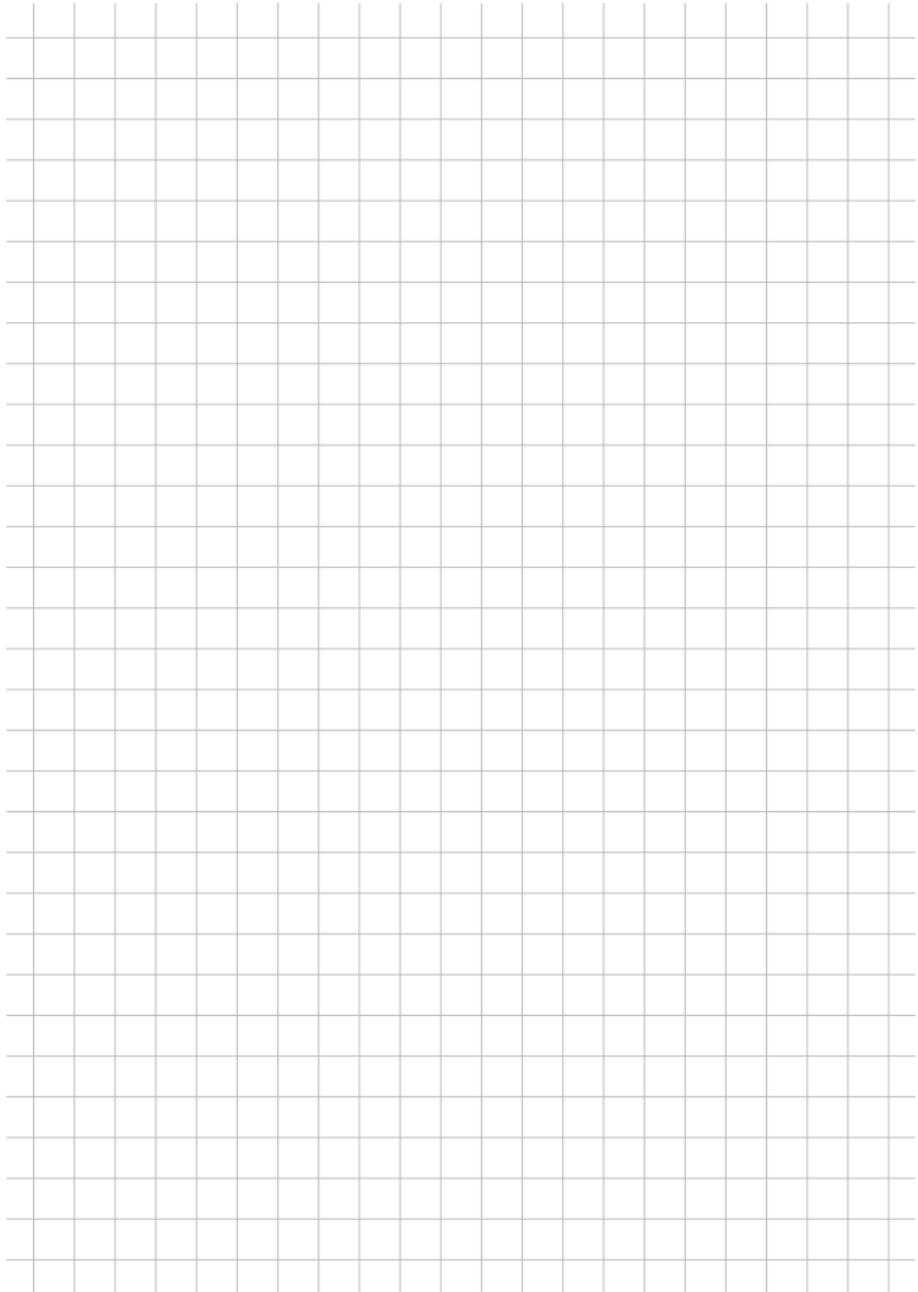
*Опционально.* Удаление культуральной среды не является обязательным для проточной цитометрии, однако, промывка раствором PBS/0,2% BSA позволяет уменьшить фоновый сигнал.

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  $\sim 575$  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](http://www.lumiprobe.com)

