

Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis Assay Kits

15 min 一步四染、线粒体膜电位检测 健康、凋亡、坏死精准区分

产品货号: C21207

产品规格: 10 T, 50 T, 100 T

储运条件: 4 °C避光保存, 冰袋运输

产品简介:

本产品为Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis Assay Kits (线粒体膜电位及凋亡检测试剂盒), 核心组分包含MitoBright™ 630、NucTrack™ 488 Caspase-3/7 Substrate、EthD Gold及Hoechst 33342, 专为同步实现细胞存活状态、凋亡进程及线粒体定位的精准检测而设计。其核心检测原理清晰互补:

(1) MitoBright™ 630 检测原理: 其在线粒体内的积累依赖于线粒体膜电位, 正常细胞中, MitoBright™ 630 对线粒体进行特异性染色, 呈明亮的深红荧光; 细胞发生凋亡时, 线粒体膜电位下降, 染料在线粒体内的积累减少, 荧光减弱或消失;

(2) NucTrack™ 488 Caspase-3/7 Substrate底物可检测细胞内的Caspase-3/7, 可被活化的Caspase-3/7 特异性切割, 释放出活化的DNA绿色荧光染料分子。活化的DNA绿色荧光染料分子迁移进入细胞核, 与DNA结合后产生明亮的绿色荧光;

(3) EthD Gold为晚期凋亡、坏死细胞特异性探针, 仅能进入细胞膜破损的晚期凋亡和坏死细胞, 并发出红色荧光;

(4) 借助Hoechst 33342 蓝色染料的全细胞穿透性, 对所有细胞的细胞核进行普遍性染色, 作为细胞计数与定量校正的稳定内参。

相较于传统单参数检测工具或需自行搭配的多组分体系, 本试剂盒具备显著优势: 由于单一指标无法在所有体系中精准定义细胞凋亡, 因此本试剂盒结合多种检测方法以实现线粒体膜电位、凋亡、坏死的可靠判定; 各探针特异性经过验证, MitoBright™ 630 具有优异的光稳定性和低细胞毒性, 适合长时间活细胞成像, NucTrack™ 488 Caspase-3/7 Substrate与Caspase-3/7 结合常数高, EthD Gold不穿透活细胞膜, 有效确保检测准确性; MitoBright™ 630 与Hoechst 33342 荧光信号持久稳定, 支持长时间观察; 适配性广泛, 可兼容荧光显微镜观察、激光共聚焦成像及流式细胞术分析, 广泛适配于药物筛选中的凋亡/坏死评估、细胞毒性研究、线粒体功能研究、细胞生物学基础研究等多种场景。

线粒体功能异常、Caspase家族蛋白酶活化及细胞膜完整性破坏是细胞命运调控中的核心事件, 三者的同步检测对解析细胞死亡机制至关重要。在生理与病理研究中, 细胞凋亡与坏死的精准区分、线粒体膜电位动态变化与凋亡进程的关联分析, 是阐明疾病发生发展(如肿瘤细胞凋亡抵抗、神经细胞退行性死亡)及药物作用机制的关键环节。本试剂盒通过多参数同步检测, 可在同一细胞样本中同时获取线粒体膜电位信息、Caspase-3/7 活化状态及细胞存活情况: 在肿瘤药物筛选中, 能快速评估药物诱导肿瘤细胞凋亡的效率, 同时观察线粒体是否参与该过程; 在神经生物学研究中, 可清晰区分神经细胞凋亡与坏死的比例, 为神经损伤机制研究提供直接依据; 在细胞毒性测试中, 能全面反映外界刺激对细胞的损伤程度及方式。其实现的“一站式”多参数检测, 打破了传统单指标检测的局限性, 为科研人员提供更全面、更精准的细胞功能评估数据, 极大提升实验效率与研究深度, 是细胞生物学、药理学及医学研究领域的重要工具。

应用范围: 活细胞凋亡过程实时动态或终点观察; 各类细胞常规凋亡数据检测; 药物/应激条件下凋亡活性筛查与定量; 凋亡与坏死等多指标联合检测; 凋亡通路机制及疾病模型验证研究; 线粒体膜电位凋亡分析

产品特点:

- **单细胞分辨率:** 提供单个细胞的 Caspase-3/7 活性、线粒体膜电位、坏死及健康状态;
- **染料特异性高:** 杜绝假阳性, EthD Gold 仅膜严重破损时进入, 排除传统 PI “瞬时渗漏”造成的坏死误判, 背景干净;
- **适配多类检测平台:** 支持荧光显微镜观察(定位凋亡细胞)与流式细胞仪分析(精准定量凋亡率);
- **操作简便性:** 一步染色即可完成多参数检测, 无需复杂预处理, 结果可直接通过流式散点图或显微图像量化;



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
技术咨询 Contact@probelives.com
订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
英文网址 www.probelives.com
Suzhou Probables Technology CO., LTD.

- **高效省时**：整体染色时间仅需 15 min，远快于传统多步检测流程，大幅提升实验效率染色时间；
- **低毒高亮**：MitoBright™ 630 工作浓度毒性极低，可适用于长期检测；
- **快速检测**：流式检测免洗涤。

产品参数：

- **NucTrack™ 488 Caspase-3/7 Substrate Ex/Em**：500/530 nm；
- **EthD Gold Ex/Em**：532/625 nm（结合 DNA）；
- **MitoBright™ 630 Ex/Em**：622/648 nm；
- **Hoechst 33342 Ex/Em**：350/461 nm（结合 DNA）。

产品组分：

组分	10 T	50 T	100 T
A. NucTrack™ 488 Caspase-3/7 Substrate	50 µL	250 µL	500 µL
B. MitoBright™ 630	10 µL	50 µL	100 µL
C. EthD Gold	10 µL	50 µL	100 µL
D. Hoechst 33342	10 µL	50 µL	100 µL

注：试剂盒使用次数为进行 96 孔板荧光显微镜检测时可检测的微孔总数。

注意事项：

- 该试剂盒必须用于未固定的细胞。染料不能用于固定细胞或组织中的活/死细胞鉴别。染料在染色后不能耐受固定。
- EthD Gold 可进行适当稀释来获得更好的信噪比。
- 建议在实验中设置单染色的对照组，流式检测中用于调节补偿。
- 试剂盒中荧光染料应避光保存。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明：

一、实验前准备

1. 试剂准备：

- 将试剂盒各组分恢复至室温，准备足量PBS缓冲液。

2. 仪器准备：

- 荧光显微镜：激发/发射波长Ex/Em：500/530 nm Ex/Em：350/461 nm Ex/Em：532/625 nm Ex/Em：622/648 nm；
- 流式细胞仪：检测通道激发/发射波长Ex/Em：500/530 nm Ex/Em：350/461 nm Ex/Em：532/625 nm Ex/Em：622/648 nm；

3. 对照组设置：

组别	NucTrack™ 488 Caspase-3 Substrate	EthD Gold	MitoBright™ 630	Hoechst 33342	样品细胞
空白对照	-	-	-	-	不做任何处理
阴性对照	+	+	+	+	不做任何处理
单阳对照 1	+	-	-	-	诱导剂处理后明显凋亡
单阳对照 2	-	+	-	-	诱导剂处理后明显凋亡



单阳对照 3	-	-	+	-	诱导剂处理后明显凋亡
单阳对照 4	-	-	-	+	诱导剂处理后明显凋亡
实验组	+	+	+	+	实验组细胞

- 空白对照组：评估背景荧光干扰、检测细胞自身的自发荧光、流式检测中用于调节阈值和电压。
- 阴性对照组：排除染料的非特异性结合，验证染色的特异性。
- 单阳对照组：排除荧光串扰，校准信号强度参数、流式检测中调节补偿。

4. 细胞准备：（96 孔板）

- 根据实验设计，对细胞进行相应的药物处理。

二、操作步骤

方案一：荧光显微镜检测（适用于悬浮细胞）

1. 收集与洗涤细胞：

- （1）收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。
- （2）1000 rpm，室温离心 5 min，小心吸弃上清液。

2. 细胞重悬与计数：

- （1）使用 PBS 重悬并细胞计数。
- （2）取 $1-1.5 \times 10^5$ 个细胞，1000 rpm 低速离心 5 min，去除 PBS。
- （3）使用 100 μ L PBS 重悬。1000 rpm 低速离心 5 min，去除上清。

注：显微镜法对细胞密度要求不严格，只要实验组与对照组密度一致即可。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整，以显微镜下视野中细胞分布清晰可辨为宜。

注：如果有孔板离心机，可直接选择孔板离心机离心并进行实验。

3. 细胞染色：

- （1）每孔/每管使用 100 μ L PBS 重悬细胞，加入 5 μ L 组分 A (NucTrack™ 488 Caspase-3/7 Substrate)，分别加入 1 μ L 组分 B (MitoBright™ 630)、组分 C (EthD Gold) 组分 D (Hoechst 33342)，轻轻吹打混匀。
- （2）室温避光孵育 15 min（孵育时间可根据预实验结果优化）。

注：各染料的使用量、染色时间可以根据不同的细胞种类、预实验或实验条件设置的使用量进行调整。

4. 洗涤与重悬：

- （1）孵育结束后，1000 rpm，室温离心 5 min，收集细胞。
- （2）小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。
- （3）加 100 μ L PBS 轻柔重悬细胞，进行洗涤，离心，吸净上清液。
- （4）加入 100 μ L PBS 轻柔重悬细胞，制成待测样品。

5. 显微镜观察与拍照：

- （1）96孔板法：将 100 μ L 细胞悬液加入 96 孔板一个孔中，静置片刻，待细胞自然沉降贴底后，置于荧光显微镜下观察。

注：细胞悬液使用量可以根据细胞计数的数量自行调整，显微镜视野中细胞分布 70%-80% 为最佳。

- （2）载玻片法：取 10-20 μ L 细胞悬液滴加于洁净载玻片上，轻轻盖上盖玻片，避免产生气泡，置于荧光显微镜下观察。
- （3）分别在预设的滤光片条件下，寻找并分别拍摄。

方案二：荧光显微镜检测（适用于贴壁细胞）

1. 细胞处理：

- （1）提前一天在孔板中接种细胞，使得细胞汇合度达到 70%-85%，待细胞贴壁后按照实验设计处理细胞。

2. 细胞清洗：

- （1）直接在培养板中吸弃细胞培养液。
- （2）根据培养板规格，加入对应体积的 PBS 轻柔洗涤细胞一次（例如：96 孔板加 100 μ L/孔，48 孔板加 150 μ L/孔，24 孔板加 250 μ L/孔，12 孔板加 500 μ L/孔，6 孔板加 1 mL/孔）。洗涤后吸净 PBS。

3. 制备染色工作液：

- （1）按照每 100 μ L 中加入 5 μ L 组分 A，分别加入 1 μ L 组分 B、组分 C、组分 D 染料加入到 PBS 中，混匀备用。

注：各染料的使用量可以根据不同的细胞种类、预实验或实验条件设置的使用量进行调整。

4. 细胞染色：



- (1) 向各孔中加入对应体积的染色工作液（体积同步骤1，例如：96孔板加100 μL /孔，48孔板加150 μL /孔，24孔板加250 μL /孔，12孔板加500 μL /孔，6孔板加1 mL/孔）。
- (2) 室温避光孵育15 min（孵育时间可根据预实验结果优化）。

5. 洗涤：

- (1) 孵育结束后，吸弃各孔中的染色工作液。
- (2) 按步骤2的体积，加入PBS洗涤细胞。

6. 显微镜观察与拍照：

- (1) 洗涤后，每孔加入对应体积的PBS，以保持细胞湿润。
- (2) 直接将培养板置于荧光显微镜下观察和拍照。滤光片设置同方案一。

方案三：流式细胞仪检测（适用于悬浮与贴壁细胞）

1. 收集与制备单细胞悬液：

- 悬浮细胞：同方案一，最终取 4×10^5 - 6×10^5 个细胞。
 - 贴壁细胞：
 - a. 将细胞培养基吸出至适合的离心管内备用。贴壁细胞用少量 PBS 清洗一遍，清洗后的 PBS 吸出后同样转移到盛装培养基的离心管内，1000 rpm，室温离心 5 min。
 - b. 加入适量胰酶消化液消化细胞。
- 注：胰酶使用量、消化时间、消化温度根据各自实验室的经验操作。
- c. 关键：加入“a 步骤”离心管内备用的细胞培养基，终止消化。
 - d. 将细胞悬液转移至合适的离心管，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清。
 - e. 收集 a 步骤与 d 步骤中的细胞；
 - f. 用 PBS 重悬细胞并进行细胞计数；
 - g. 取 4×10^5 - 6×10^5 个细胞，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清；
 - h. 100 μL PBS 清洗细胞，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清；

注：胰酶消化步骤对于贴壁细胞很关键。消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落容易造成机械损伤，导致细胞凋亡的假阳性；消化时间过长，同样会造成细胞凋亡的假阳性。

2. 细胞染色：

- (1) 用100 μL PBS重悬细胞；
- (2) 加入5 μL 组分A (NucTrack™ 488 Caspase-3/7 Substrate)，分别加入1 μL 组分B (MitoBright™ 630)、组分C (EthD Gold)、组分D (Hoechst 33342)，轻轻吹打混匀；
- (3) 室温避光孵育15 min（孵育时间可根据预实验结果优化）。

3. 洗涤与重悬：

- (1) 孵育结束后，加入400 μL PBS轻柔重悬细胞，制成流式上机样品。

4. 上机检测：

- (1) 重要：染色完成后1 h内进行流式检测，以保证荧光信号稳定。
- (2) 用流式细胞仪在预设的检测通道下进行分析。
- (3) 首先通过空白对照（未染色细胞）调节电压，使细胞群位于坐标系左下角。
- (4) 然后检测阴性对照和阳性对照，确认实验体系成立。
- (5) 最后检测实验样品，记录并分析细胞的平均荧光强度。

三、结果判读：

1. 定性分析（显微镜）：



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
 技术咨询 Contact@probelives.com
 订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
 英文网址 www.probelives.com
 Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

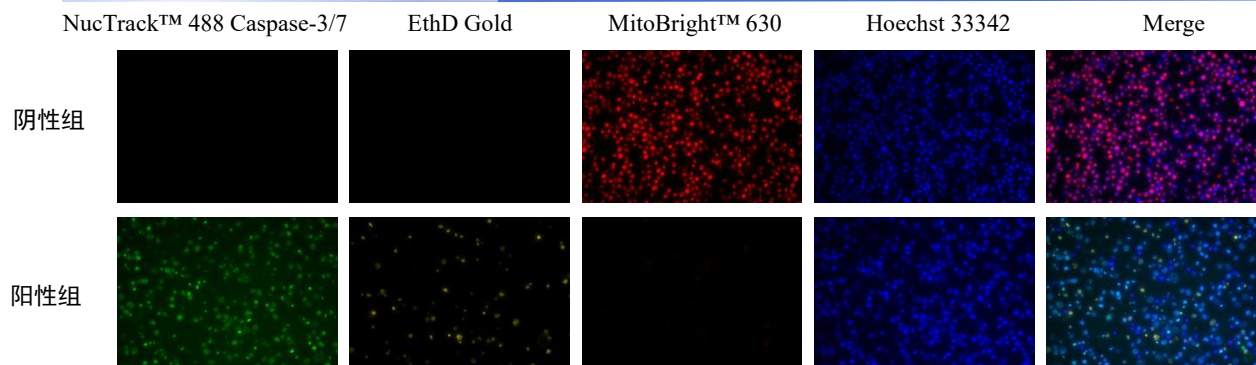


图 1. Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis Assay Kits 荧光镜检拍照

- (1) 阴性组: K562正常细胞, 进行NucTrack™ 488 Caspase-3/7 Substrate、BF™ 647-Annexin V、EthD Gold、MitoBright™ 630、Hoechst 33342同时共染后合成画Merge;
- (2) 阳性组: 诱导凋亡处理后的K562细胞, 进行NucTrack™ 488 Caspase-3/7 Substrate、BF™ 647-Annexin V、EthD Gold、MitoBright™ 630、Hoechst 33342同时共染后合成画Merge。

结果判读:

正常细胞: 线粒体被 MitoBright™ 630 染成红色, Hoechst 33342 将细胞核染成蓝色; 凋亡细胞: Caspase-3/7 活性明显增加 (绿色荧光亮度、细胞个数显著增强), EthD Gold 信号明显增加 (黄色荧光亮度、细胞个数明显增加), 线粒体染色明显降低 (红色荧光强度、细胞个数显著降低), Hoechst 33342 将细胞核染成蓝色。

结果表明, K562 细胞经过凋亡诱导后, 线粒体膜电位下降乃至消失, Caspase-3/7 活性明显增加, 表明药物激活了细胞的凋亡程序, 导致细胞凋亡, 表明该药物促进了细胞的凋亡。

注: 实际检测结果可能因检测仪器、操作条件、细胞类型等差异产生不同, 本示例仅提供参考。

2. 定量分析 (流式细胞仪):

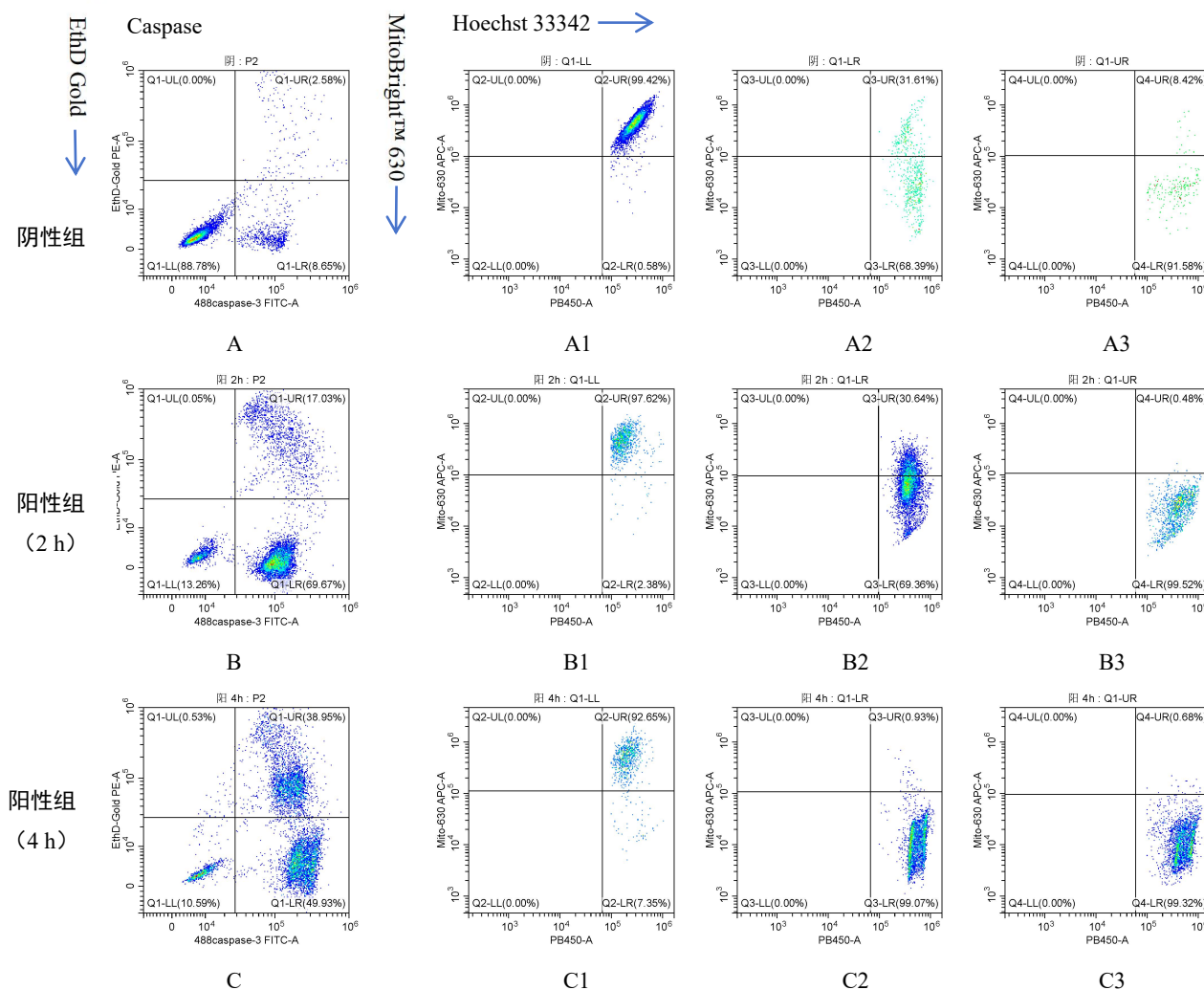


图 2. Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis Assay Kits 流式分析



以 FSC-SSC 构建散点图，来确定细胞群，并记录 10000 个事件，以 Caspase 为 X 轴，EthD Gold 为 Y 轴，将完整细胞群分为健康细胞（左下）、早期凋亡细胞（右下）、晚期凋亡细胞（右上）；并对单个细胞群（按照象限）进行线粒体膜电位分析，以 Hoechst 33342 为 X 轴，MitoBright™ 630 为 Y 轴检测线粒体膜电位变化情况。

结果判读：以阳性组（2 h）为例（凋亡药物处理 2 h）：图 B 可以区分出健康细胞（左下）、早期凋亡细胞（右下）、晚期凋亡细胞（右上），图 B1 表明健康细胞中有线粒体膜电位细胞的占比；图 B2 表明早期凋亡细胞中有线粒体膜电位细胞的占比，图 B3 表明晚期凋亡细胞中有线粒体膜电位细胞的占比。

注：此占比并非是占总细胞数（10000 个细胞）的占比，而是分析图 B 中三个不同分群中，有线粒体膜电位的细胞分别占各自群体的比例。

结果判读 1：计算三个细胞分群中有线粒体膜电位的细胞占总细胞的个数。

例：（以凋亡诱导 2 h 为例）

计算早期凋亡细胞有膜电位的细胞个数： $10000 \times 69.67\% \times 30.64\% = 2134$

结果判读 2：细胞经过凋亡诱导后，随着凋亡诱导时间的增加线粒体膜电位下降，Caspase 信号与 EthD Gold 信号增加。表明该药物促进了细胞的凋亡。

注：实际检测结果可能因检测仪器、操作条件等差异产生不同，本示例仅供参考。

常见疑问与解答：

● 问：可以在染色前或染色后使用固定细胞吗？

答：要观察凋亡细胞的不同状态，只能用活细胞诱导凋亡后进行检测。如果将细胞进行固定，细胞在固定过程中将全部死亡，染色结果将出现大量的假阳性凋亡或信号。

● 同样作为死细胞染料，为什么选择 EthD Gold 而不选择 PI 进行标记？

答：EthD Gold 在与 PI 具有相同的染色结果的基础上，表现出更具有选择性的优势：

a. 亮度更高：与 DNA 结合后荧光强度比 EthD-I 再提升 45%，同等曝光下信号更强，拍照或流式检测更敏感。

b. 特异性更好：分子量、膜通透性要求更严格，仅标记膜严重破损的细胞，不标记“轻度膜渗漏”的晚期凋亡，减少假阳性。

c. 毒性更低：工作浓度可比 PI 低 3-7 倍即可达到同等或更高荧光，长时间孵育几乎不引起额外细胞死亡，流式坏死群比例更接近真实。

d. 无 RNA 干扰：几乎不与 RNA 结合，无需额外 RNase 处理，DNA 群像更干净，流式直方图 CV 值更小。

e. 分群更锐利：双参数图上 EthD Gold 阳性群与阴性群间距大，早期/晚期/坏死三种界限清晰，便于 gate 设定。

f. 兼容固定前检测：虽同样不可固定，但在“活染-上机”流程中信号稳定，固定前拍照/采集不会出现 PI 常见的洗脱-扩散问题。

● 问：使用贴壁细胞进行流式检测时为什么要保留培养细胞的培养基？

答：药物处理后的细胞已经存在凋亡或坏死细胞，这些细胞的贴壁能力逐渐降低，会游离在培养基中，染色检测时需将这部分细胞考虑进去，否则检测结果中可能凋亡或坏死细胞的比例会比较低，对药物效果或者细胞处理效果的评价会产生错误判断；且细胞培养基中含有的血清能够高效的中和胰酶。

