

MitoBright™ Deep Red FM Mitochondrial Probe

高特异性深红线粒体探针，活细胞染色稳定，兼容固定通透

产品货号：C22511

产品规格：50 µg

储运条件：-20 °C避光保存，冰袋运输

产品简介：

MitoBright™ Deep Red FM Mitochondrial Probe是专为活细胞线粒体高特异性标记与功能检测开发的羧花青类远红光荧光探针，仅用于科研用途。产品核心组分为高纯度MitoBright™ Deep Red FM Mitochondrial Probe荧光探针，分子带有弱巯基反应性氯甲基官能团，适配各类主流生命科学检测平台。本产品核心原理为：探针可通过被动运输快速穿透活细胞膜，特异性聚集于活性线粒体，其氯甲基官能团可与线粒体内蛋白游离巯基共价结合，实现线粒体精准稳定锚定，同时可灵敏响应线粒体膜电位动态变化，通过荧光强度直观反映线粒体功能完整性与细胞生理状态。与TMRM、罗丹明 123 等传统探针相比，本产品优势显著：一是固定兼容性优异，共价结合特性可耐受醛类固定与去垢剂通透处理，荧光信号稳定保留，解决传统探针固定后信号严重流失的痛点；二是光谱兼容性极佳，Ex/Em=644 nm/665 nm，与绿、红色荧光蛋白及常用探针无光谱重叠，无交叉串色，完美适配多色荧光共染；三是兼顾定位与功能检测，标记不绝对依赖膜电位，膜电位崩解后仍可稳定标记线粒体位置，同步实现形态可视化与功能评价；四是低浓度无细胞毒性，操作简便，仅需简单孵育即可完成染色。本产品广泛适配荧光显微镜、激光共聚焦成像、流式细胞术、多色免疫荧光复标、高通量药物筛选、细胞凋亡与线粒体功能等基础研究场景。

线粒体是真核细胞能量代谢与信号调控的核心细胞器，其形态、膜电位的动态变化与细胞凋亡、自噬、氧化应激等生理病理过程密切相关，活细胞线粒体的高稳定标记与功能检测，是生命科学多领域的核心基础技术。传统线粒体探针普遍存在膜电位依赖性过强、固定后信号流失、光谱串色、特异性差等痛点，难以满足多色共染、免疫荧光复标、固定后下游实验等核心需求。本产品性能稳定，可实现活细胞线粒体高对比度标记，精准捕捉线粒体裂变、融合等动态过程；可与各类荧光蛋白、凋亡标志物、靶标抗体灵活联用，完成共定位分析与多维度细胞生理检测；可灵敏响应线粒体膜电位异常，为细胞凋亡、氧化应激损伤等研究提供量化指标；适配靶向线粒体药物的高通量筛选与药效评价，兼容免疫组化、原位杂交等固定后下游实验。本产品为线粒体相关研究提供了高稳定、高灵敏、高兼容性的标准化工具，攻克了传统探针的核心痛点，可显著提升实验效率与结果可靠性，助力科研人员解析线粒体核心调控机制，为线粒体相关疾病的机制研究、靶向药物研发提供坚实支撑，推动相关基础研究的创新突破与临床转化。

注：效能等同于ThermoFisher MitoTracker™ Dyes for Mitochondria Labeling (M22426)。

注：MitoTracker™ 为 Thermo Fisher 的商标及注册商标。

应用范围：活细胞线粒体特异性荧光标记与形态学、动态学观察，长时程活细胞线粒体动态成像追踪，固定/通透后样本的线粒体荧光成像与后续抗体标记，多色荧光共染、免疫荧光染色、多细胞器共定位分析；

产品特点：

- **超高特异性：**与线粒体内蛋白共价结合，线粒体靶向性强，可清晰分辨线粒体精细网状结构；
- **适合多色搭配：**Ex/Em=644 nm/665 nm 与 GFP、RFP 等无串色干扰，适配多色荧光实验；
- **固定兼容性强：**活细胞染色后可耐受 4%多聚甲醛固定、Triton X-100 通透处理；
- **膜电位响应灵敏：**线粒体聚集依赖线粒体膜电位，可精准响应膜电位动态变化；
- **低浓度无细胞毒性：**20 nM 即可实现明亮荧光标记，对细胞生理状态影响极小；

产品参数：

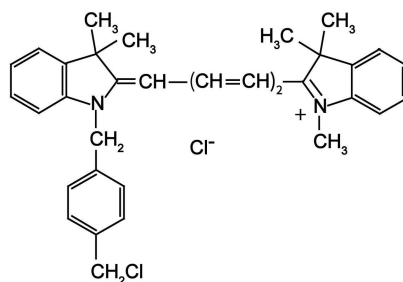
- **外观：**蓝色/深蓝色固体；
- **Ex/Em：**644 nm/665 nm；



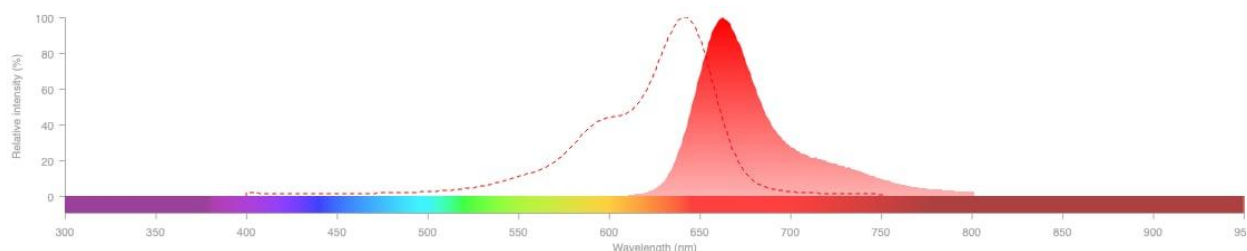
仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
技术咨询 Contact@probelives.com
订购咨询 Sales@probelives.com

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

- CAS 号: 873315-86-7;
- 分子式: $C_{34}H_{36}Cl_2N_2$;
- 分子量: 543.58;
- 分子结构图:



- 光谱图:



产品组分:

组分	4500 T
MitoBright™ Deep Red FM Mitochondrial Probe	50 µg

注: 以 96 孔板进行检测每孔使用 100 µL 染色工作液, 染色工作液浓度 200 nM 计算。

注意事项:

- MitoBright™ Deep Red FM Mitochondrial Probe 溶解时, 优先使用无水 DMSO 作为溶剂。
- 本产品需在活细胞状态下进行染色, 不适合用于固定后细胞/组织的直接染色, 染色完成后可进行固定、通透处理。
- 荧光染料均存在淬灭问题, 全程请尽量避免光操作与保存, 以减缓荧光淬灭。
- 使用前请将产品瞬时离心, 再进行后续操作。
- 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:

- 将试剂从储存条件 (如 -20 °C) 取出, 避光平衡至室温 (15~25 °C)。
- 准备细胞培养基、无水 DMSO 和 PBS 缓冲液。
- 染料储液: 将恢复至室温的 MitoBright™ Deep Red FM Mitochondrial Probe 固体粉末瞬时离心后, 用无水 DMSO 制备 200 µM 的储液。举例: 50 µg 规格的 MitoBright™ Deep Red FM Mitochondrial Probe 固体粉末恢复室温, 瞬时离心后, 加入 460 µL 无水 DMSO, 制备 200 µM 储液 (或根据实验需求制备 1mM 储液: 50 µg 规格的 MitoBright™ Deep Red FM Mitochondrial Probe 固体粉末恢复室温, 瞬时离心后, 加入 92 µL 无水 DMSO, 制备 1 mM 储液)。
- 染色工作液储液制备: 用 37 °C 预热的无血清培养基或 PBS 将储液稀释至 200 nM, 临用前制备, 立即使用。

注: 未使用的储液分装后 -20 °C 避光保存, 避免反复冻融。

注: 染色工作液终浓度可在 20 nM~200 nM 之间调整具体浓度根据不同样品有所不同。

注: 若染色后需进行固定、通透处理, 建议工作液终浓度调整为 50 nM~500 nM。



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 Probabilities Technology CO., LTD.

2. 仪器准备:

- 荧光显微镜: 配备644 nm激发光源或Cy5通道的荧光显微镜
- 流式细胞仪: 配备644 nm激发光源或Cy5通道的流式细胞仪

二、操作步骤

方案一: 悬浮细胞标记

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) 将细胞密度调整为 1×10^6 个/mL, 1000 rpm 低速离心 5 min, 去除 PBS。

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(推荐范围: $10^5 \sim 10^7$ cells/mL)。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。

3. 细胞染色:

- (1) 向 1 mL 细胞悬液中加入 1 μ L 预温育的 200 μ M 染色工作液的储液至终浓度为 200 nM, 轻轻重悬混匀, 置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中, 避光孵育 15 min, 孵育时长可根据不同的样本类型进行灵活调整, 调整区间为 15~45 min。

注: 工作液浓度及染色孵育时间均可能因为不同的细胞种类要求不同, 建议染色终浓度在建议浓度 20 nM~200 nM 范围内摸索, 若染色后需进行固定、通透处理, 建议工作液终浓度在 50 nM~500 nM 范围内摸索, 孵育时间以 15~45 min 之间进行摸索。

- (2) 1000 rpm 离心 5 min。倾倒入上清液, 缓慢加入 37 $^{\circ}$ C 预热的生长培养液轻柔重悬细胞。
- (3) 重复步骤 (2) 1 次。
- (4) 用 1 mL 37 $^{\circ}$ C 预热的生长培养液轻柔重悬细胞。

4. 检测:

- (1) 使用流式细胞仪检测, 使用 644 nm 的光源进行激发或选用 Cy5 进行检测;
- (2) 在荧光显微镜下检测, 可以将细胞分装到微孔板或滴加到载玻片上进行成像, 使用 644 nm 的光源进行激发或选用 Cy5 进行检测。

方案二: 贴壁细胞标记

1. 细胞准备

- (1) 接种培养: 将细胞接种于 96 孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上;

注: 贴壁细胞荧光显微镜检测接种量为 24~48 h 后预期汇合度达到 70%~80%。

注: 不同细胞类型需结合实际实验条件和细胞特性灵活调整。

- (2) 染色工作液制备: 用 37 $^{\circ}$ C 预热的无血清培养基或 PBS 将染色工作液储液稀释至 200 nM, 临用前制备, 立即使用。

3. 细胞染色:

- (1) 向各孔中加入对应体积的染色工作液(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)。37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 孵育时长可根据不同的样本类型进行灵活调整, 调整区间为 15~45 min。

- (2) 96 孔板进行实验时对应的染色工作液体积参考下表

样本(孔)	1	5	10	20
染色工作液体积	100 μ L	500 μ L	1000 μ L	2000 μ L

注: 工作液浓度及染色孵育时间均可能因为不同的细胞种类要求不同, 建议染色终浓度在建议浓度 20 nM~200 nM 范围内摸索, 若染色后需进行固定、通透处理, 建议工作液终浓度在 50 nM~500 nM 范围内摸索, 孵育时间以 15~45 min 之间进行摸索。

- (3) 去除染色工作液, 加入预热的生长培养基清洗细胞, 去除生长培养基, 再重复清洗步骤 2 次。

4. 检测:

- (1) 保留适量培养基(覆盖细胞即可), 置于荧光显微镜下, 使用 644 nm 的光源进行激发或选用 Cy5 进行检测;

方案三: 染色后细胞固定与通透处理(选做, 适用于后续免疫荧光共染实验)

1. 细胞固定



- (1) 完成活细胞染色并洗涤后，吸除培养液，加入 37 °C 预温育的 4% 多聚甲醛固定液，室温避光固定 15~30 min。
- (2) 固定完成后，用 PBS 洗涤细胞 2~3 次，每次 5 min，去除残留固定液。
- (3) 若需通透处理，向细胞中加入含 0.2% Triton X-100 的 PBS，室温避光孵育 10~15 min。
- (4) 通透完成后，用 PBS 洗涤细胞 2~3 次，即可进行后续免疫荧光染色、抗体孵育等实验操作。

注：37 °C 预热固定液并在 37 °C 条件下固定 15 min，可更好地维持细胞形态与荧光信号；也可使用 -20 °C 预冷的 100% 甲醇固定 15 min，需提前优化固定条件以保障荧光保留效果。

三、结果判读

● 定性分析（显微镜）：

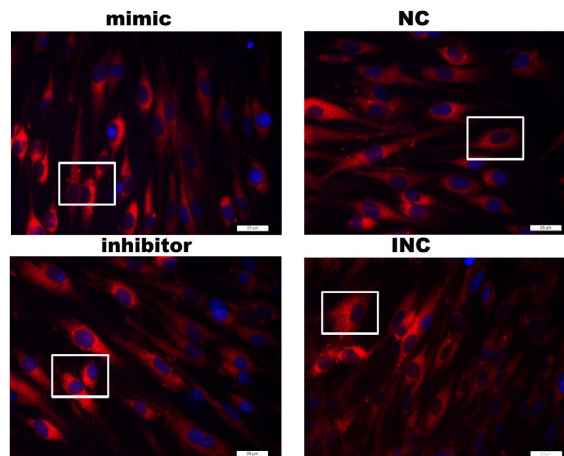


图 1. 瘢痕疙瘩成纤维细胞荧光显微成像

- 过表达 miR-21（mimic 组）：线粒体分裂显著减少，细胞内碎片化线粒体数量降低；
- 抑制 miR-21（inhibitor 组）：线粒体分裂显著增加，碎片化线粒体数量大幅上升。

注：图片引自参考文献《MicroRNA-21 inhibits mitochondria-mediated apoptosis in keloid》(DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108047) 瘢痕疙瘩成纤维细胞分别转染 miR-21 mimic、阴性对照 (NC)、miR-21 inhibitor、抑制剂阴性对照 (INC)，转染 12 h 后，用 MitoBright™ Deep Red FM Mitochondrial Probe 对细胞线粒体进行荧光染色，通过荧光显微镜观察线粒体形态并统计碎片化线粒体数量。

常见疑问与解答：

- 问：染色后仅观察到细胞核周围弥散状荧光，无法看清线粒体精细结构，如何解决？
答：可能原因及解决方法：
 - a. 探针工作浓度过高易导致非特异性染色，建议降低工作液终浓度，优化至 20~100 nM 之间；
 - b. 染色后未充分洗涤导致游离探针残留，建议增加洗涤次数，用 37 °C 预热的培养液/PBS 洗涤 2~3 次；
 - c. 孵育时间过长导致探针非特异性结合，建议缩短孵育时间至 15 min，优化最佳孵育时长；
 - d. 细胞状态不佳、线粒体碎片化，建议更换对数生长期的健康细胞重复实验。
- 问：染色后荧光信号弱、无明显阳性染色，是什么原因？
答：可能原因及解决方法：
 - a. 储存液/工作液配制错误、反复冻融导致探针失效，建议重新配制新鲜储存液与工作液，分装保存避免反复冻融；
 - b. 探针工作浓度过低，建议适当提高工作液终浓度（最高不超过 500 nM）；
 - c. 孵育时间过短，建议延长孵育时间至 30 min，或 37 °C 避光孵育后室温继续孵育 10 min；
 - d. 细胞线粒体膜电位丧失，探针无法聚集，建议使用健康的活细胞进行实验，设置阳性对照组；
 - e. 荧光显微镜/流式细胞仪检测通道设置错误，确认使用 Cy5 通道，匹配 644 nm 激发、665 nm 射的检测参数。
- 问：固定通透后荧光信号大幅下降，如何优化？
答：可能的原因有以下几点：
 - a. 适当提高活细胞染色时的探针工作浓度，建议使用 200~500 nM 工作液进行染色；
 - b. 延长活细胞染色孵育时间至 30~60 min，增强探针与线粒体内蛋白的共价结合效率；
 - c. 优化固定条件，避免使用甲醇/丙酮等强穿透性固定剂长时间固定，优先使用 4% 多聚甲醛 37 °C 温和固定 15 min；
 - d. 降低通透液中 Triton X-100 浓度，缩短通透时间，减少探针流失。

