

Mitochondrial Permeability Transition Pore Assay Kit

线粒体通透性转换孔 (MPTP) 检测试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL928A	线粒体通透性转换孔 (MPTP) 检测试剂盒	100T-1000T

产品简介:

线粒体通透性转换孔检测试剂盒 (Mitochondrial Permeability Transition Pore Assay Kit) 是一种采用膜通透性的荧光探针 Calcein AM 检测线粒体通透性转换孔开放程度的试剂盒。相比于基于线粒体膜电位的方法更直接地检测到线粒体通透性转换孔开放程度的变化。由于 Calcein AM 的毒性特别低, 并且不会抑制细胞的增殖、趋化性等绝大部分功能, 所以与其它同类产品如 CFDA SE 等相比是更适合染活细胞的荧光探针。

本试剂盒的检测原理如下, Calcein AM 是一种可以对活细胞进行荧光染色的非极性染料, 可通过被动运输进入细胞内并在细胞质组分包括线粒体等中积累。在细胞中, 几乎没有荧光的 Calcein AM 被细胞内的酯酶水解去除乙酰甲酯, 生成没有膜通透性的极性荧光染料钙黄绿素 (Calcein or Fluorexon), 从而使 Calcein 滞留在细胞内, 并使细胞质包括线粒体等呈现强绿色荧光。Calcein 本身是一种金属络合指示剂, 在生理 pH 条件下和 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 等金属离子络合时, 荧光信号会发生淬灭。本试剂盒提供了 CoCl_2 用于淬灭细胞质中 Calcein 的绿色荧光, 但由于正常情况下线粒体的 MPTP 是关闭的, 此时 CoCl_2 不能进入线粒体, 所以 Calcein AM 染色后经 CoCl_2 处理会导致仅线粒体内呈现 Calcein 的绿色荧光。作为对照, 可将细胞用 Calcein AM 染色并经过 CoCl_2 处理之后, 用钙离子载体 Ionomycin 进一步处理以诱导细胞外的 Ca^{2+} 大量进入细胞内和线粒体基质并导致 MPTP 的开放, 或者用适当的条件刺激细胞导致 MPTP 少量或大量开放, 从而使部分 Calcein 释放进入细胞浆和钴离子结合而失去荧光, 同时细胞浆中的钴离子能进入线粒体内而导致其中的 Calcein 的绿色荧光部分甚至全部淬灭, 最终导致线粒体中 Calcein 绿色荧光减弱或消失。这样根据线粒体中 Calcein 绿色荧光的强弱来判断线粒体 MPTP 开放的程度, 绿色荧光越强, 开放程度越低, 绿色荧光越弱, 开放程度越高。

如果用于流式细胞仪, 每个样品的检测体系体积为 1ml 时, 可以进行 100 次检测; 96 孔板每孔检测体系的体积为 100 μ l 时可以检测 1000 次。

产品组份:

编号	产品名称	规格
BL928A-1	检测缓冲液	200mL
BL928A-2	Calcein AM (1000X)	110 μ L
BL928A-3	CoCl_2 (100X)	1mL
BL928A-4	Ionomycin (200X)	600 μ L
BL928A-5	促溶剂 (100X)	1.2mL

使用方法 (仅供参考):

一、试剂准备:

1. **Calcein AM 染色液 (Calcein AM staining solution) 的配制:** 以 10 个样品使用流式细胞仪检测为

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



例，需要配制 10ml Calcein AM 染色液，即取 10 μ l 的 Calcein AM (1000X)和 100 μ l 促溶剂(100X)加入到 10ml 的检测缓冲液中混匀。

注：①促溶剂可增强 Calcein AM 的水溶性、减少 Calcein AM 在检测缓冲液中的析出、改善染色效果并降低荧光背景。促溶剂非必须，特殊情况下也可不添加于检测缓冲液中。

②Calcein AM 染色液建议现配制现使用，不能长期保存，请根据待检测的样品数量，计算当次的使用量。

③本试剂盒中的检测缓冲液含有 Ca²⁺，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；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 Calcein AM 的进入细胞内的效率。

④染色液中 Calcein AM 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。Calcein AM 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. 荧光淬灭工作液(Fluorescence quenching solution)的配制：在 Calcein AM 染色液中添加 CoCl₂ (100X)使其终浓度为 1X。例如，每 1ml Calcein AM 染色液中加入 10 μ l 的 CoCl₂ (100X)，混匀。

注：CoCl₂ 的终浓度推荐为 1X，通常此时的淬灭效果比较好。CoCl₂ 的终浓度也可以根据实验中所使用细胞的种类进行适当优化，以摸索出最佳的淬灭效果，可在 0.1X-1X 之间进行调整。

3. Ionomycin 对照(Ionomycin control)的配制：在荧光淬灭工作液中加入 Ionomycin (200X)使其终浓度为 1X，也可以在 0.4X-6X 之间进行调整。

4. 各种溶液配制见下表(其中检测缓冲液根据需要添加促溶剂)。以各配制 10ml 为例，实际溶液需求量根据实验方案和样品数量而定：

溶液	溶剂	试剂	储存液浓度	终浓度	体积
Calcein AM 染色液	检测缓冲液	Calcein AM	1000X	1X	10 μ l
荧光淬灭工作液	Calcein AM 染色液	CoCl ₂	100X	1X	100 μ l
Ionomycin 对照	荧光淬灭工作液	Ionomycin	200X	1X	50 μ l

二、贴壁细胞的荧光显微镜检测：

1. 将细胞接种于培养皿、多孔细胞培养板或者细胞爬片上，按实验设计对细胞进行一定处理。
2. 吸除培养液，用 PBS 清洗细胞 1-2 遍。
3. 加入适当体积的 Calcein AM 染色液、荧光淬灭工作液或 Ionomycin 对照，轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞。一般 96 孔板每孔体积为 100 μ l，24 孔板每孔体积为 250 μ l，12 孔板每孔体积为 500 μ l，6 孔板每孔体积为 1ml。

4. 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30-45min，不同的细胞最佳孵育时间有所不同。以 30min 作为初始孵育时间，根据所用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳效果。

5. 孵育结束后，更换成新鲜的 37 $^{\circ}$ C 预热的培养液，37 $^{\circ}$ C 再避光孵育 30min，以保证细胞内酯酶充分水解 Calcein AM 以生成有绿色荧光的 Calcein。

6. 吸除培养液，用 PBS 清洗 2-3 次，然后加入检测缓冲液即可在荧光显微镜下观察。注意整个过程均需避光操作。

三、悬浮细胞的荧光显微镜检测：

1. 细胞按实验设计进行一定处理后，计数。取适当细胞 1000g 室温离心 5min，弃上清，加入适当体积的 Calcein AM 染色液、荧光淬灭工作液或 Ionomycin 对照，使细胞密度约为 1 \times 10⁶/ml。

2. 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30-45min，不同的细胞最佳孵育时间有所不同。以 30min 作为初始孵育时间，根据所用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳效果。

3. 孵育结束后，1000g 室温离心 5min，吸除上清液，缓慢加入 37 $^{\circ}$ C 预热的培养液重悬细胞。

4. 重复步骤 3 两次或以上。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



5. 更换新鲜的 37°C 预热的培养液, 37°C 再避光孵育 30 分钟, 以保证细胞内酯酶充分水解 Calcein AM 以生成有绿色荧光的 Calcein。

6. 1000g 室温离心 5min, 吸除大部分培养液, 将细胞重悬后涂片, 在荧光显微镜下观察。注意整个过程均需避光操作。

四、流式细胞仪检测:

1. 贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬, 悬浮细胞直接使用, 计数。每个样品分四份, 每份按照 1mL 每管, 细胞密度为 1×10^6 /ml, 1000g 室温离心 5min, 弃上清。分别加入 1ml 的检测缓冲液、Calcein AM 染色液、荧光淬灭工作液或 Ionomycin 对照重悬, 使细胞为单细胞悬液。

2. 37°C 避光孵育 30min。

3. 孵育完成后, 1000g 室温离心 5min 收集细胞。每个样品加入 1ml 检测缓冲液, 轻轻重悬, 1000g 室温离心 5min 收集细胞。

4. 用 400 μ l 检测缓冲液重悬细胞。如有需要, 也可进行进一步染色。注意整个过程均需避光操作。染色后, 将样品置于冰上, 可以在 1 小时内进行流式细胞仪检测和分析。

5. 注意使用仅含检测缓冲液的并且未经染色的细胞样品用于流式细胞仪的阴性对照设置。Calcein 的最大激发光波长为 494nm, 最大发射光波长为 517nm。

五、结果分析:

仅含 Calcein AM: 线粒体和细胞质都有绿色荧光, 荧光信号较强; 含荧光淬灭工作液: 仅线粒体有绿色荧光, 荧光强度中等; 含 Ionomycin 对照: 线粒体和细胞质绿色荧光均被淬灭, 荧光信号比较弱或者几乎没有。

绿色荧光信号变化说明线粒体通透性转换孔被打开, 从而部分 Calcein 从线粒体内被释放, 同时导致钴离子进入线粒体内而引起其中的 Calcein 绿色荧光发生淬灭。

注意事项:

1. 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。

2. Calcein AM (1000X) 须尽量避免反复冻融。如果多次使用, 请注意适当分装。

3. CoCl₂ 有腐蚀性, 对人体有害或有刺激性, 对人体有呼吸道、生殖等特定器官毒性, 或致畸致癌毒性, 操作时请小心, 并确保有效防护以避免直接接触人体或吸入体内, 并须注意避免腐蚀其它物品。

4. CoCl₂ 对水生生物有毒或有害, 禁止直接排入环境。

5. 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。

6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件:

-20°C 保存, 一年有效。Calcein AM (1000X) 和 Ionomycin (200X) 需要避光保存。

