

线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSO™ Red)

产品编号	产品名称	包装
S0061S	线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSO™ Red)	20-200次
S0061M	线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSO™ Red)	100-1000次

产品简介:

- 碧云天生产的线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSO™ Red) (Mitochondrial Superoxide Assay Kit with MitoSO™ Red)是一种以MitoSO™ Red为荧光探针,快速灵敏地检测线粒体内超氧化物变化的试剂盒。本试剂盒可使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光酶标仪、流式细胞仪等荧光检测系统进行检测。
- 超氧化物通常指超氧化物阴离子(Superoxide anion) $O_2^{\cdot-}$,是一种氧分子的自由基。在呼吸链中,NADPH氧化酶把电子传递给氧分子的时候,就会产生超氧化物阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 。超氧化物阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 是一种强氧化剂,可以由被刺激的白细胞等产生,从而抵御微生物的感染等。超氧化物阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 也可以导致氧化损伤,和许多疾病的发生密切相关[1-3]。
- MitoSO™ Red,简称MSR,也称MitoSOX Red、MitoROS、Mito-HE,分子量为759.7,分子式为 $C_{43}H_{43}IN_3P$,是一种新型的用于线粒体内超氧化物检测的荧光探针,其可快速、特异性地靶向线粒体,从而有选择性地检测线粒体内的超氧化物。MitoSO™ Red是带有阳离子三苯基磷酸基团的二氢乙锭衍生物。二氢乙锭(Hydroethidine, HE)可以被活性物质(如超氧化物)氧化为乙锭,然后与DNA结合产生荧光。MitoSO™ Red显示出同样的特性,可被超氧化物迅速氧化,但不被其它活性氧(Reactive oxygen species, ROS)和活性氮(Reactive nitrogen species, RNS)氧化,氧化产物结合核酸后,产生强荧光[4-6]。
- 本试剂盒检测线粒体内超氧化物的原理如图1所示。MitoSO™ Red的磷酸基团上的正电荷被三个亲脂苯基包围,从而有助于其进入活细胞并选择性地靶向进入线粒体,最终可以被超氧化物氧化。被氧化的MitoSO™ Red与线粒体内核酸结合,产生强烈的红色荧光,MitoSO™ Red有两个激发峰,分别约为396nm和510nm,发射波长约为580nm。396nm的激发峰在其它活性氧(ROS)产生的乙锭类氧化产物的激发光谱中不存在,因此选择在396nm进行激发,可能对于线粒体超氧化物的检测更为特异[5-6]。

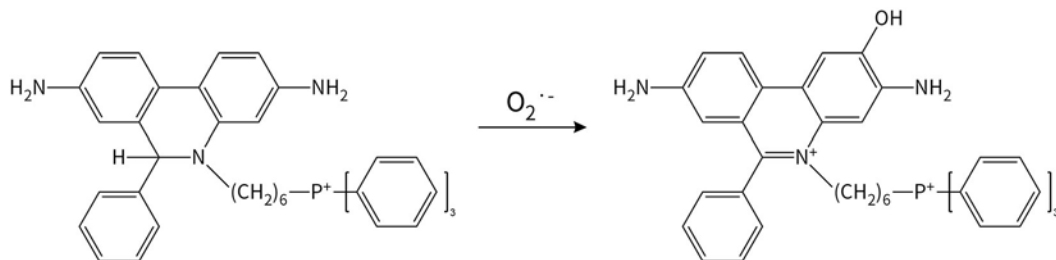


图1. 碧云天线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSO™ Red) (S0061)检测原理图。

- 本试剂盒提供的MitoSO™ Red为5mM储存液。本试剂盒推荐的最终使用浓度经过优化,对大多数细胞都适用,但为了得到更满意的结果,对于不同类型的细胞请自行进行一定摸索,MitoSO™ Red的终浓度通常为1-5 μ M,最优先的推荐终浓度为5 μ M。过量MitoSO™ Red在线粒体积累会造成细胞损伤,因此MitoSO™ Red的工作浓度不能超过5 μ M,否则可能会产生细胞毒性,例如改变线粒体形态,MitoSO™ Red重新分布到胞核或胞质中等。同时,本试剂盒提供的mSoxUp作为诱导细胞线粒体内超氧化物生成的阳性对照,终浓度通常为0.5-2X,最优先的推荐终浓度为1X。使用本试剂盒检测细胞线粒体内超氧化物的效果参考图2和图3。

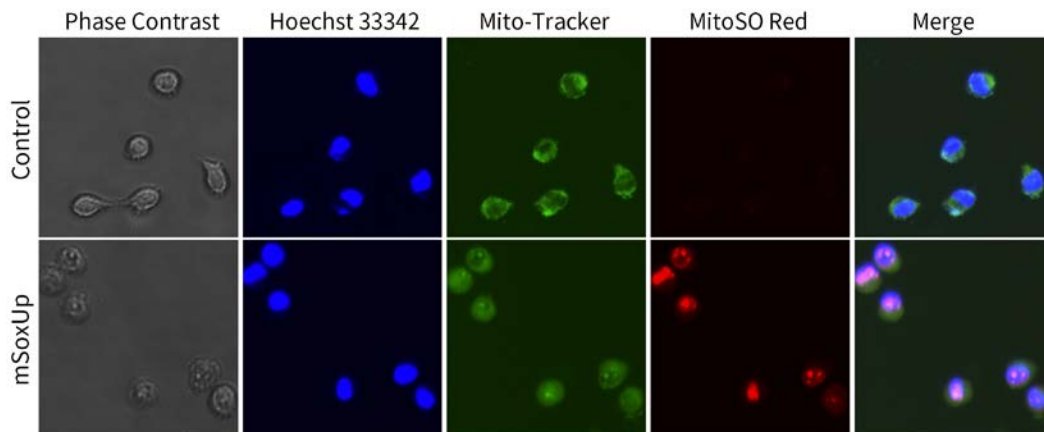


图2. 碧云天线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSO™ Red) (S0061)检测L929细胞(小鼠成纤维细胞)线粒体内超氧化物的荧光显微

镜效果图。L929细胞不处理或用阳性对照试剂mSoxUp处理后，使用本试剂盒和Hoechst 33342以及Mito-Tracker Green进行染色。正常的L929细胞中未氧化MitoSO™ Red，细胞中红色荧光非常弱，几乎观察不到红色荧光；使用诱导线粒体内超氧化物生成的阳性对照试剂mSoxUp处理后，线粒体内超氧化物生成增加，MitoSO™ Red与超氧化物反应并重新分布，与线粒体及细胞核DNA结合，细胞中线粒体及细胞核的红色荧光显著增强[7]。蓝色荧光为Hoechst 33342标记的所有细胞的细胞核。绿色荧光为Mito-Tracker Green标记的所有细胞的线粒体。本试剂盒中不提供Hoechst 33342和Mito-Tracker Green，如有需要，可向碧云天订购Hoechst 33342染色液(C1022-C1029)、Mito-Tracker Green (C1048)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

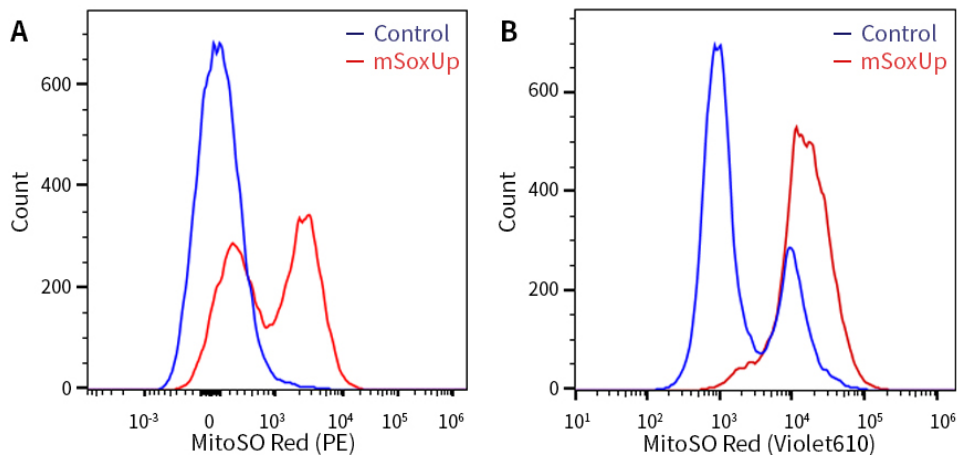


图3. 碧云天线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSO™ Red) (S0061)检测L929细胞(小鼠成纤维细胞)线粒体内超氧化物的流式细胞术效果图。L929细胞不处理或用阳性对照试剂mSoxUp处理后，使用本试剂盒进行染色并进行流式细胞术检测。正常的L929细胞中未氧化MitoSO™ Red，细胞中红色荧光非常弱；使用诱导线粒体内超氧化物生成的阳性对照试剂mSoxUp处理后，线粒体内超氧化物生成增加，细胞中的红色荧光显著增强。分别通过PE (Ex/Em=561/585)和Violet610 (Ex/Em=405/610)通道进行检测，Violet610通道信号更强一些但对对照组的背景信号也更强一些，此时可能具有更好的特异性。参考细胞的荧光照片，类似的PE (Ex/Em=561/585)通道进行检测，此时具有更好的信噪比。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- 本试剂盒小包装和中包装，MitoSO™ Red (5mM)按照1:1000的比例稀释，6孔板每孔检测体系为1ml时，可以分别进行20和100次检测；96孔板每孔检测体系为100μl时，可以分别检测200和1000次。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0061S-1	MitoSO™ Red (5mM)	20μl
S0061S-2	mSoxUp (1000X)	20μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0061M-1	MitoSO™ Red (5mM)	100μl
S0061M-2	mSoxUp (1000X)	50μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。MitoSO™ Red (5mM)须避光保存，-80°C保存效果更好。

注意事项：

- BSA和酚红(Phenol red)对本荧光探针的检测有干扰，需避免。
- 对于特定细胞的检测，建议先进行预实验，以确定适当的荧光探针浓度和孵育时间。
- 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。
- 根据文献报道，MitoSO™ Red在与超氧化物反应后可能会重新分布，并与线粒体或细胞核DNA结合[7]，因此可以观察到红色荧光集中在细胞核。
- 本试剂盒仅限于进行存活的细胞或组织的检测，不可用于固定或冻存的细胞或组织样品的检测。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板，推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(FCP965)。
- 第一次使用时请分装成小包装后-20°C保存，以避免反复冻融。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. MitoSO™ Red染色工作液的配制:

6孔板每孔所需MitoSO™ Red染色工作液的量为1ml, 其它培养器皿的MitoSO™ Red染色工作液的用量以此类推; 对于细胞悬液每50-100万细胞需0.5ml MitoSO™ Red染色工作液。取适量MitoSO™ Red (5mM), 按照每1 μ l MitoSO™ Red (5mM)加入1ml PBS (C0221A)的比例稀释MitoSO™ Red, 混匀后即为MitoSO™ Red染色工作液。

注1: 配制MitoSO™ Red染色工作液时注意避光, 且须现配现用, 稀释后不能长期保存。

注2: MitoSO™ Red染色工作液中MitoSO™ Red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。MitoSO™ Red的初始推荐工作浓度为5 μ M, 可以在2-50 μ M范围内摸索最佳工作浓度。如果阳性对照的染色偏弱, 可以适当提高浓度; 如果背景染色偏强, 可以适当降低浓度。对于特定细胞的检测, 建议先进行预实验。

2. 阳性对照的设置:

把试剂盒中提供的mSoxUp (1000X)推荐按照1:1000的比例加入到细胞培养液中, 处理细胞4小时。随后按照下述方法加入MitoSO™ Red染色工作液, 进行线粒体内超氧化物的检测。对于大多数细胞, 通常mSoxUp (1X)处理4小时后超氧化物含量大量增加, MitoSO™ Red染色后观察应呈现较强的红色荧光; 而正常的细胞经MitoSO™ Red染色后应呈现微弱的红色荧光。对于特定的细胞, mSoxUp作用浓度和作用时间可能有所不同, 需自行摸索最佳工作浓度作用时间, 甚至某些细胞可能对mSoxUp不敏感。

3. 对于悬浮细胞:

a. 细胞按照实验设计进行一定处理后, 酌情取约10-100万细胞600 \times g室温离心5分钟, 弃上清, 加入适当体积的MitoSO™ Red染色工作液重悬细胞, 使细胞密度为100万-1000万/ml。

b. 细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育10-60分钟, 不同的细胞最佳孵育时间不同。可以以30分钟作为初始孵育时间, 根据作用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

注: 如果孵育30分钟的染色偏弱, 建议调整为孵育60分钟; 如果孵育30分钟的背景染色偏强, 建议调整为孵育10-15分钟。

c. 37 $^{\circ}$ C孵育结束后, 600 \times g 4 $^{\circ}$ C离心3-4分钟, 沉淀细胞。弃上清, 注意尽量不要吸除细胞。

d. 用PBS洗涤2次: 加入1ml PBS重悬细胞, 600 \times g 4 $^{\circ}$ C离心3-4分钟, 弃上清。再加入1ml PBS重悬细胞, 600 \times g 4 $^{\circ}$ C离心3-4分钟, 弃上清。

e. 再用适量PBS重悬细胞后, 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察, 也可以用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

4. 对于贴壁细胞:

注: 对于贴壁细胞, 如果希望采用流式细胞仪检测, 可以先消化并收集细胞, 重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

a. 对于6孔板的一个孔, 吸除培养液, 根据具体实验如有必要可以用PBS或其它适当溶液洗涤细胞一次。如果使用其它的多孔板, 各种试剂的用量需要相应按比例调整。

b. 加入1ml MitoSO™ Red染色工作液。细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育10-60分钟, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以30分钟作为初始孵育时间, 根据作用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

注: 如果孵育30分钟的染色偏弱, 建议调整为孵育60分钟; 如果孵育30分钟的背景染色偏强, 建议调整为孵育10-15分钟。

c. 37 $^{\circ}$ C孵育结束后, 吸除上清, 用PBS洗涤2次。

d. 加入2ml PBS, 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。如果考虑使用荧光酶标仪检测, 优先推荐使用碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(FCP965), 分别进行顶读或底读模式进行荧光检测。

5. 参数设置:

MitoSO™ Red和超氧化物反应产物的荧光光谱, 如果用于流式细胞仪或共聚焦显微镜检测, 可以使用396nm激发波长、610nm发射波长进行检测, 对于超氧化物的检测更精准, 可以实时、逐时间点或单时间点检测刺激前后荧光的强弱。流式细胞仪可以用Violet610 (Ex/Em=405/610)通道进行检测。对于普通的荧光显微镜, 也可以使用510nm激发波长、580nm发射波长进行检测, 但可能也可以检测到其它的活性氧。

6. 其它说明:

上述推荐的MitoSO™ Red的初始工作浓度为5 μ M, 对于某些细胞, 如果发现没有刺激的阴性对照细胞荧光也比较强, 可以按照1:2000-1:5000的比例稀释MitoSO™ Red, 使装载探针时MitoSO™ Red的浓度为1-2.5 μ M。另外, 探针装载的时间也可以根据情况适当进行调整。

参考文献:

1. Shchepinova MM, Cairns AG, Prime TA, Logan A, James AM, et al. Cell Chem Biol. 2017. 24(10):1285-1298. e12.
2. Holmström KM, Finkel T. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014. 15(6):411-421.
3. Fridovich I. Aging Cell. 2004. 3(1):13-16.
4. Kauffman ME, Kauffman MK, Traore K, Zhu H, Trush MA, et al. React Oxyg Species (Apex). 2016. 2(5):361-370.
5. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. 103(41):15038-15043.
6. Robinson KM, Janes MS, Beckman JS. Nat Protoc. 2008. 3(6):941-947.
7. Johnson-Cadwell L I, Jekabsons M B, Wang A, et al. J Neurochem. 2007. 101(6): 1619-1631.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C1022	Hoechst 33342	10mg
C1025	Hoechst 33342染色液	10ml

C1026	Hoechst 33342染色液	50ml
C1027	Hoechst 33342活细胞染色液(100X)	0.1ml
C1028	Hoechst 33342活细胞染色液(100X)	0.5ml
C1029	Hoechst 33342活细胞染色液(100X)	3ml
C1032	Mito-Tracker Deep Red FM (线粒体远红外荧光探针)	50/250µg
C1034	Mito-Tracker Deep Red 633 (线粒体远红外荧光探针)	50/250µg
C1035	Mito-Tracker Red CMXRos (线粒体红色荧光探针,高纯度)	50/250µg
C1048	Mito-Tracker Green (线粒体绿色荧光探针)	50µg
C2001S	线粒体膜电位检测试剂盒(TMRE)	100-1000次
C2003S	增强型线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)	>100次
C2005	JC-1	1mg
C2006	线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)	>100次
C2008S	线粒体膜电位检测试剂盒(Rhodamine 123)	100-1000次
S0033S	活性氧检测试剂盒	>100次
S0033M	活性氧检测试剂盒	>500次
S0060	超氧化物检测试剂盒	100次
S0061S	线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSO™ Red)	20-200次
S0061M	线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSO™ Red)	100-1000次
S0063	Dihydroethidium (超氧化物阴离子荧光探针)	5mg
S0067-100µg	SOSG (单线态氧绿色荧光探针)	100µg

Version 2025.02.16