



线粒体超氧化物检测试剂盒

货号: R43283

规格: 100-1000T

产品简介:

线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSOX Red) (Mitochondrial Superoxide Assay Kit with MitoSOX Red)是一种以MitoSOX 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。

MitoSOX Red, 简称MSR, 也称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。MitoSOX Red 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。MitoSOX 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。

本试剂盒检测线粒体内超氧化物的原理如图1所示。MitoSOX 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MitoSOX Red与线粒体内核酸结合, 产生强烈的红色荧光, MitoSOX 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。

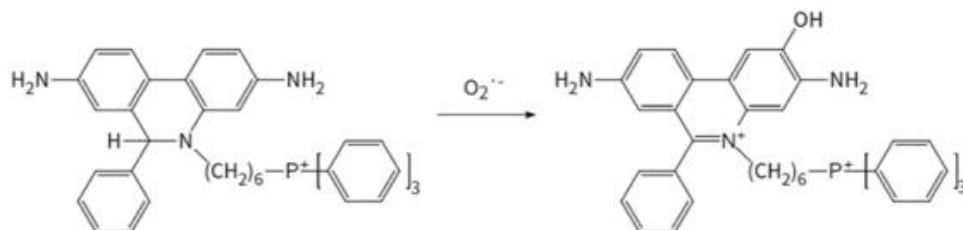


图1. 线粒体超氧化物检测试剂盒检测原理图。

本试剂盒提供的MitoSOX 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，MitoSOX 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MitoSOX Red在线粒体积累会造成细胞损伤，因此MitoSOX 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，MitoSOX 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。

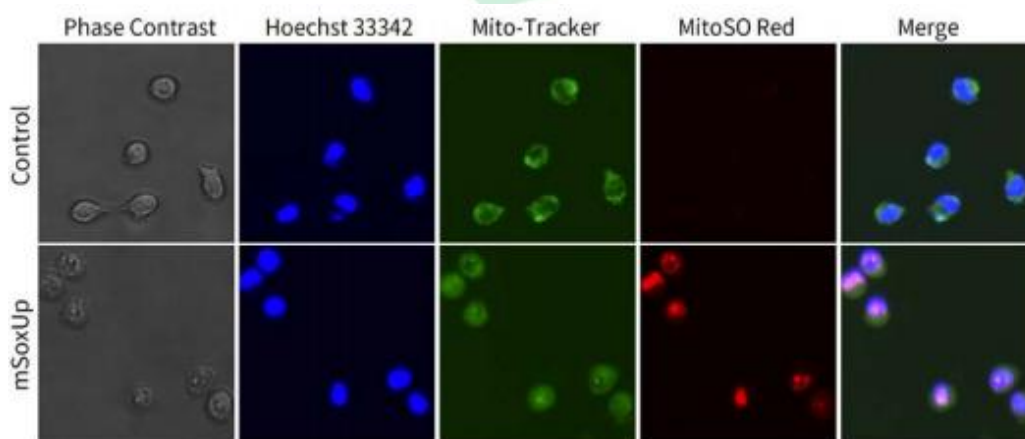


图2. 线粒体超氧化物检测试剂盒检测L929细胞(小鼠成纤维细胞)线粒体内超氧化物的荧光显微镜效果图。L929细胞不处理或用阳性对照试剂mSoxUp处理后，使用本试剂盒和Hoechst 33342以及Mito-Tracker Green进行染色。正常的L929细胞中未氧化MitoSOX Red，细胞中红色荧光非常弱，几乎观察不到红色荧光；使用诱导线粒体内超氧化物生成的阳性对照试剂mSoxUp处理后，线粒体内超氧化物生成增加，MitoSOX Red与超氧化物反应并重新分布，与线粒体及细胞核DNA结合，细胞中线粒体及细胞核的红色荧光显著增强。蓝色荧光为Hoechst 33342标记的所有细胞的细胞核。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，可向源叶订购。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。

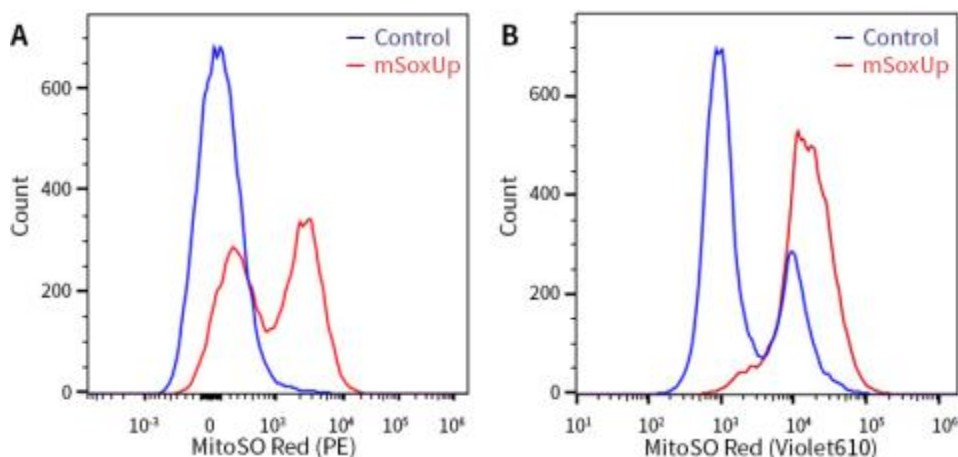


图3. 线粒体超氧化物检测试剂盒检测L929细胞(小鼠成纤维细胞)线粒体内超氧化物的流式细胞术效果图。L929细胞不处理或用阳性对照试剂mSoxUp处理后,使用本试剂盒进行染色并进行流式细胞术检测。正常的L929细胞中未氧化MitoSOX Red,细胞中红色荧光非常弱;使用诱导线粒体内超氧化物生成的阳性对照试剂mSoxUp处理后,线粒体内超氧化物生成增加,细胞中的红色荧光显著增强。分别通过PE (Ex/Em=561/585)和Violet610 (Ex/Em=405/610)通道进行检测, Violet610通道信号更强一些但对照组的背景信号也更强一些,此时可能具有更好的特异性。参考细胞的荧光照片,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。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R43283-1	MitoSOX Red (5mM)	100μl
R43283-2	mSoxUp (1000X)	50μl
说明书		1份

保存条件:

-20℃保存, 一年有效。MitoSOX Red (5mM)须避光保存, -80℃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, MitoSOX 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, 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, 推荐使用全黑96孔细胞培养板或黑色透明底96孔细胞培养板。

第一次使用时请分装成小包装后-20℃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. MitoSOX Red染色工作液的配制:

6孔板每孔所需MitoSOX Red染色工作液的量为1ml, 其它培养器皿的MitoSOX 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 MitoSOX Red染色工作液。取适量MitoSOX Red (5mM), 按照每1μl MitoSOX Red (5mM)加入1ml PBS 的比例稀释MitoSOX Red, 混匀后即为MitoSOX Red染色工作液。

注1: 配制MitoSOX 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: MitoSOX Red染色工作液中MitoSOX 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。MitoSOX Red的初始推荐工作浓度为5μM, 可以在2-50μM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MitoSOTM 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，MitoSOX Red染色后观察应呈现较强的红色荧光；而正常的细胞经MitoSOX 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×g室温离心5分钟，弃上清，加入适当体积的MitoSOX 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℃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℃孵育结束后，600×g 4℃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×g 4℃离心3-4分钟，弃上清。再加入1ml PBS重悬细胞，600×g 4℃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 MitoSOX Red染色工作液。细胞培养箱中37°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°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，推荐使用的全黑96孔细胞培养板或黑色透明底96孔细胞培养板，分别进行顶读或底读模式进行荧光检测。

5. 参数设置：

MitoSOX 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MitoSOX 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MitoSOX Red，使装载探针时MitoSOX 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。