

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures

Version 2.0

线粒体膜通透性转换孔检测试剂盒

Mitochondrial Permeability Transition Pore Assay Kit

Cat.No.MMK5824

Size : 100 tests

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com.

E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com

产品简介

线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP), 又称线粒体巨型通道 (mitochondrial megachannel, MMC), 是存在于线粒体内外膜之间的非选择性高导电性通道, 由多种蛋白质复合物组成。线粒体通透性转换孔的开放是引起细胞死亡的关键事件, 在细胞的生存和凋亡的调控过程中扮演着重要角色, 同时线粒体通透性转换孔在心肌缺血、再灌注损伤、创伤性脑损伤、中风等心血管疾病及肿瘤、衰老、神经变性等多个方面都有重要作用。正常的细胞线粒体内膜可维持正常的线粒体电位梯度以保证细胞呼吸作用及能量供应, 随着 Ca^{2+} 的摄入和释放, 一种低电导渗透性转换孔在张开和闭合中来回切换。当细胞发生凋亡时和病理性死亡时, 线粒体膜电位转换孔渗透性发生改变, Ca^{2+} 的过载, 线粒体谷胱甘肽的氧化, 活性氧水平的升高, 包括后继细胞色素 C 的释放, 线粒体膜电位下降等都会导致线粒体渗透性转换孔的激活。

MesGen Biotech 的线粒体通透性转换孔检测试剂盒 (Mitochondrial Permeability Transition Pore Assay Kit or MPTP Assay Kit) 是一种采用膜通透性荧光探针 Calcein AM 检测线粒体通透性转换孔开放程度的试剂盒, 也常用于研究细胞凋亡、坏死等细胞死亡。本试剂盒比基于线粒体膜电位的方法能更直接地检测到线粒体通透性转换孔开放程度的变化。

检测原理

试剂盒使用荧光探针钙黄绿素乙酰甲酯 (calcein acetoxymethyl ester, 即 Calcein AM) 染色细胞。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



Do not eat Store at -20°C & in dark



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 释放进入细胞浆和钙离子结合而失去荧光, 同时细胞浆中的钙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。这样就可以根据线粒体中 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。

试剂盒组成

Stain Buffer	250 mL
Calcein AM 1000X	120 μ l
$CoCl_2$ 100X	1 mL
Ionomycin (100 μ M)	600 μ l

本试剂盒以 1ml 标记体系计算, 可供 100 次检测。检测最大激发波长 494 nm, 最大发射波长 517 nm。

使用说明

1. 溶液准备:

a. Calcein AM 染色液配制: 即取 1 体积的 Calcein AM (1000X) 加入到 1000 体积的 Stain buffer 中混匀。

备注 1: Calcein AM 染色液建议现配制现使用, 不能长期保存。

备注 2: Stain buffer 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。

备注 3: 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。

b. 荧光淬灭工作液配制: 在 Calcein AM 染色液中添加 $CoCl_2$ (100X) 使其终浓度为 1X, 混匀。

备注 1: $CoCl_2$ 的终浓度推荐为 1X, 通常此时的淬灭效果比较好。

$CoCl_2$ 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。

c. Ionomycin 对照配制: 在荧光淬灭工作液中加入 Ionomycin 使其终浓度为 0.5 μ M。

备注1: Ionomycin的终浓度建议为0.5 μ M,也可以在0.2 μ M -3 μ M之间进行调整。

2. 贴壁细胞的荧光显微镜检测:

- 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。
- 吸除培养液,用PBS清洗细胞1-2遍。
- 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。
- 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。
- 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。
- 吸除培养液,用PBS清洗2-3次,然后加入Stain Buffer即可在荧光显微镜下观察。如有需要,也可进行进一步非绿色荧光的染色。如用Hoechst 33342活细胞染色液染色细胞核等。注意整个过程均需避光操作。

3. 悬浮细胞的荧光显微镜检测:

- 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 1×10^6 /ml。
- 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。
- 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。
- 重复步骤c两次或以上。
- 更换新鲜的37 $^{\circ}$ C预热的培养液,37 $^{\circ}$ 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。
- 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。如用Hoechst 33342活细胞染色液染色细胞核等。注意整个过程均需避光操作。

4. 流式细胞仪检测:

- 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,取适量细胞1000g室温离心5min,弃上清,加入适当体积的Stain Buffer、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,并且细胞密度为 1×10^6 /ml,每个样品体积为1ml。

备注1: 需要准备好仅含Stain Buffer的细胞样品用作流式细胞仪检测时的阴性对照。

- 37 $^{\circ}$ C避光孵育30min。

- 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。

备注1: 本步骤可去除多余染料及可能引起荧光淬灭的试剂。

- 用400 μ l Stain Buffer重悬细胞。如有需要,也可进行进一步染色。如用Hoechst 33342活细胞染色液染色细胞核等。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。

- 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。

5. 结果示例:

- 仅含Calcein AM: 线粒体和细胞质都有绿色荧光,荧光信号较强;
 - 含Calcein AM和CoCl₂: 仅线粒体有绿色荧光,荧光强度中等;
 - 含Calcein AM、CoCl₂和Ionomycin: 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。
- b和c的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。

运输和保存方法

冰袋运输。-20 $^{\circ}$ C避光干燥保存,避免反复冻融,有效期6个月。

注意事项

为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作!

产品仅供科学研究 禁止用于临床诊断、治疗

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.