

线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSOX Red)

产品货号: BA3020

产品规格: 20-200次/100-1000次

产品简介:

线粒体超氧化物检测试剂盒(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MitoSOX、Mito-HE,分子量为759.7,分子式为 $C_{43}H_{43}N_3P$,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。

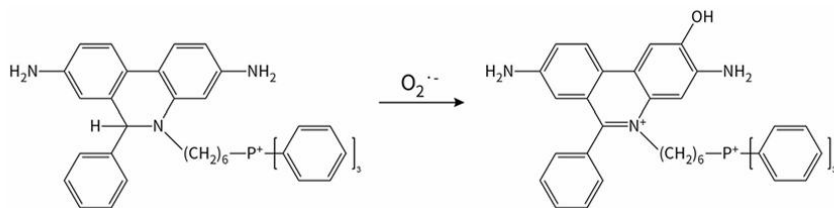


图1. 乐业线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSOX Red) (S0061)检测原理图。

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0.5-2 \times ,最优先的推荐终浓度为1 \times 。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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

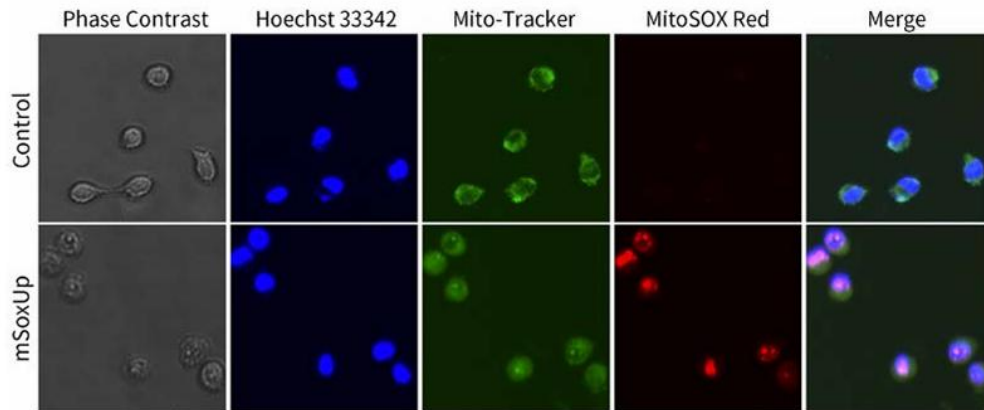


图2. 乐业线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSOX Red)检测L929细胞(小鼠成纤维细胞)线粒体内超氧化物的荧光显微镜效果图。L929细胞不处理或用阳性对照试剂mSoxUp处理后,使用本试剂盒和Hoechst 33342以及Mito-Tracker Green进行染色。正常的L929细胞中未氧化MitoSOX Red,细胞中红色荧光非常弱,几乎观察不到红色荧光;使用诱导线粒体内超氧化物生成的阳性对照试剂mSoxUp处理后,线粒体内超氧化物生成增加,MitoSOX Red与超氧化物反应并重新分布,与线粒体及细胞核DNA结合,细胞中线粒体及细胞核的红色荧光显著增强。蓝色荧光为Hoechst 33342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

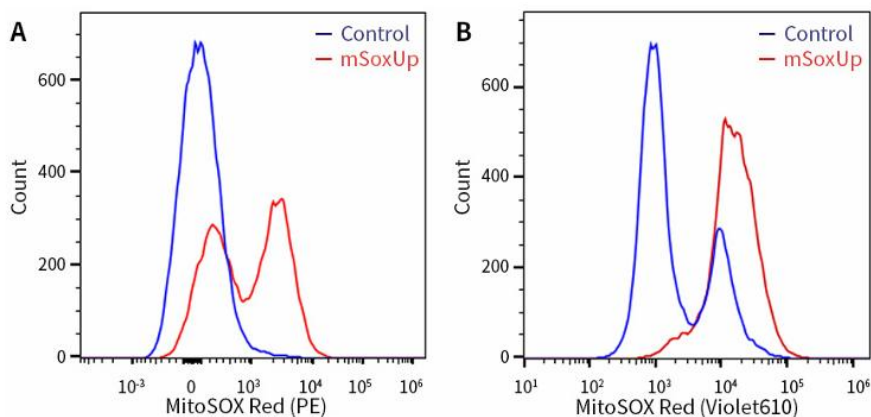


图3. 乐业线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSOX Red)检测L929细胞(小鼠成纤维细胞)线粒体内超氧化物的流式细胞术效果图。L929细胞不处理或用阳性对照试剂mSoxUp处理后,使用本试剂盒进行染色并进行流式细胞术检测。正常的L929细胞中未氧化MitoSOX Red,细胞中红色荧光非常弱;使用诱导线粒体内超氧化物生成的阳性对照试剂mSoxUp处理后,线粒体内超氧化物生成增加,细胞中的红色荧光显著增强。分别通过PE (Ex/Em=561/585)和Violet610 (Ex/Em=405/610)通道进行检测,Violet610通道信号更强一些但对照组的背景信号也更强一些,此时可能具有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

本试剂盒小包装和中包装, MitoSOX 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100 μ l时,可以分别检测200和1000次。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

产品组成:

产品名称	20-200次	/100-1000次	保存条件
试剂(A): MitoSOX Red (5mM)	20 μ l	100 μ l	-20 $^{\circ}$ C,避光
试剂(B): mSoxUp (1000 \times)	20 μ l	50 μ l	-20 $^{\circ}$ C

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1 μ l MitoSOX Red (5mM)加入1ml PBS的比例稀释MitoSOX Red, 混匀后即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的推荐工作浓度为5 μ M, 可以在1-5 μ M范围内摸索最佳工作浓度。

2. 阳性对照的设置:

把试剂盒中提供的mSoxUp (1000 \times)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MitoSOX 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 (1 \times)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:

- 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MitoSOX Red染色工作液重悬细胞, 使细胞密度为100万-1000万/ml。
- 细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育10-30分钟, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以15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。
- 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。
- 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。
- 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。

- 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。
- 加入1ml MitoSOX Red染色工作液。细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育10-30分钟, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以15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。
- 37 $^{\circ}$ C孵育结束后, 吸除上清, 用PBS洗涤2次。
- 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, 优先推荐使用乐业的全黑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,



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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。

注意事项：

1. BSA和酚红(Phenol red)对本荧光探针的检测有干扰，需避免。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板，推荐使用乐业全黑96孔细胞培养板或黑色透明底96孔细胞培养板。
6. 第一次使用时请分装成小包装后-20 $^{\circ}$ C保存，以避免反复冻融。
7. 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。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

效期：12个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com