

线粒体通透性转换孔(MPTP)检测试剂盒说明书

Mitochondrial Permeability Transition Pore Assay Kit

货号：100-118

产品保存：

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

产品简介：

线粒体通透性转换孔检测试剂盒（Mitochondrial Permeability Transition Pore Assay Kit，简称 MPTP Assay Kit）可以通过具有膜通透性的荧光探针 Calcein AM实现对线粒体通透性转换孔开放程度的检测。在细胞凋亡、坏死等细胞死亡相关研究中有广泛应用。

本试剂盒使用一种非极性染料Calcein AM对活细胞进行荧光染色。Calcein AM进入细胞后，在细胞质（包括线粒体）中累积。细胞内的酯酶水解可以使原本无荧光信号的Calcein AM生成无膜通透性的极性荧光染料钙黄绿素(Calcein or Fluorexon)，发强绿色荧光。Calcein 是金属络合指示剂，若与 Co^{2+} 等金属离子结合，荧光会被淬灭。由于正常情况下线粒体的 MPTP 处于关闭状态， CoCl_2 无法进入线粒体，所以经 Calcein AM 染色并用 CoCl_2 处理后，细胞质的荧光会被淬灭，只有线粒体呈现绿色荧光。如果此时用钙离子载体 Ionomycin 诱导细胞外的 Ca^{2+} 进入细胞及线粒体，MPTP 将少量或大量开放。此时，线粒体里的部分 Calcein 会释放到细胞浆，并与钴离子结合失去荧光，同时钴离子会进入线粒体，使线粒体内 Calcein 的绿色荧光部分甚至全部淬灭，最终线粒体的绿色荧光减弱或消失。通过观察线粒体中绿色荧光的强弱，即可判断线粒体 MPTP 的开放程度：荧光越强，MPTP开放程度越低；荧光越弱，MPTP开放程度越高。

Calcein AM水解产物Calcein的最大激发光波长为494nm，最大发射光波长为517nm。

Calcein AM 毒性极低，不会抑制细胞增殖、趋化性等绝大多数功能，因此相较于 CFDA-SE 等同类产品，它是更适合同类细胞染色的荧光探针。

产品组成

货号	组分（50-500T）*	规格
100-118A	检测缓冲液	100 mL
100-118B	Calcein AM (1000×)	50 μL
100-118C	CoCl_2 (200×)	500 μL
100-118D	Ionomycin (200×)	250 μL

*如用于流式检测，每个样品的检测体系体积为1 mL，本试剂盒可进行50次检测；如使用显微镜观察，96孔板每孔检测体系的体积为100 μL ，本试剂盒可以检测500次。

使用说明

一、制备反应溶液：

1. 配制Calcein AM染色液（以流式检测为例，10个样本需配制10 mL Calcein AM染色液）：

取10 μL 的Calcein AM (1000×)加入到10 mL的检测缓冲液中混匀。

请注意：

- Calcein AM染色液应现配现用，请勿长期保存。
- 本试剂盒配备的检测缓冲液含 Ca^{2+} ，能在一定时间内维持细胞正常状态并提供适量营养。该缓冲液可用细胞培养液替代，但需注意不能使用含血清的培养基，因为血清会降低 Calcein AM 进入细胞的效率。
- 染色液中Calcein AM的最终浓度需根据实际情况进行调整。可在 $0.1 \times -5 \times$ 范围内调整。

2. 配制荧光淬灭工作液：

按1:200的比例将 CoCl_2 (200 $\times$)加入Calcein AM染色液中，使 CoCl_2 稀释200倍至1 $\times$ 。例如，每10 mL Calcein AM染色液中加入50 μL 的 CoCl_2 (200 $\times$)，混匀。

注： CoCl_2 的终浓度推荐为1 $\times$ ，通常淬灭效果较好。 CoCl_2 的终浓度可以根据实际情况优化，可在0.1 $\times$ -1 $\times$ 之间进行调整。

3. 配制Ionomycin对照：

按1:200的比例将Ionomycin (200 $\times$)加入荧光淬灭工作液中，使Ionomycin稀释200倍至1 $\times$ 。例如，每10 mL 荧光淬灭工作液中加入50 μL 的Ionomycin (200 $\times$)，混匀。根据实验实际情况，Ionomycin的终浓度可以在0.4 $\times$ -6 $\times$ 之间调整。

4. 溶液配制详情见下表。表格以各溶液配制10 mL为例：

溶液	溶剂	试剂	浓储液浓度	使用终浓度	体积
Calcein AM染色液 (A)	检测缓冲液	Calcein AM	1000 $\times$	1 $\times$	10 μL
荧光淬灭工作液(B)	A	CoCl_2	200 $\times$	1 $\times$	50 μL
Ionomycin对照(C)	B	Ionomycin	200 $\times$	1 $\times$	50 μL

二、贴壁细胞的荧光显微镜检测：

1. 将细胞接种于合适的培养皿中。去除培养基，用PBS清洗细胞1-2次。
2. 分别加入适当体积的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孔板每孔加入液体体积为100 μL ，24孔板每孔加入液体体积为250 μL ，12孔板每孔加入液体体积为500 μL ，6孔板每孔加入液体体积为1mL。
3. 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30-45 min（最佳孵育时间与细胞类型有关，请根据实际检测的细胞摸索最佳孵育时间）。
4. 去除反应液，给细胞加入新鲜37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30min，保证细胞内酯酶充分水解Calcein AM生成有绿色荧光的Calcein。
5. 去除培养基，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。**注意检测反应全程均需避光操作。**

三、悬浮细胞的荧光显微镜检测：

1. 对需要检测的细胞进行计数。取适当细胞1000 $\times\text{g}$ 室温离心5 min，弃上清，用适当体积的Calcein AM染色液、荧光淬灭工作液或Ionomycin对照重悬细胞，使细胞密度约为 $1\times 10^6/\text{mL}$ 。
2. 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30-45 min（最佳孵育时间与细胞类型有关，请根据实际检测的细胞摸索最佳孵育时间）。
3. 孵育结束后，1000 $\times\text{g}$ 室温离心5 min，去除上清液，缓慢加入新鲜37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的培养基重悬细胞。
4. 重复步骤3两次或以上。
5. 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min，以保证细胞内酯酶充分水解Calcein AM生成有绿色荧光的 Calcein。
6. 1000 $\times\text{g}$ 室温离心5 min，去除大部分培养基，将细胞重悬后涂片，在荧光显微镜下观察。**注意检测反应全程均需避光操作。**

四、流式细胞仪检测：

1. 使用胰酶将贴壁细胞消化收集于ep管中，用培养基重悬；悬浮细胞可直接使用。对需要检测的细胞进行计数，取适量细胞1000 $\times\text{g}$ 室温离心5 min，弃上清，加入适当体积的检测缓冲液、Calcein AM染色液、荧光淬灭工作液或Ionomycin对照重悬，制作单细胞悬液，并且使细胞密度为 $1\times 10^6/\text{mL}$ ，每个样品体积为1 mL。
注意：需要准备仅含检测缓冲液的细胞样品用作流式细胞仪检测时的阴性对照。
2. 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min。

3. 孵育完成后，室温1000×g离心5 min，去除上清液收集细胞。每个样品加入1 mL检测缓冲液，轻轻重悬，1000×g室温离心5 min收集细胞。注意：本步骤可去除多余染料及可能引起荧光淬灭的试剂。
4. 用400 μL检测缓冲液重悬细胞。**注意：整个过程均需避光操作。**染色后，将样品置于冰上，可在1小时内进行流式细胞仪检测和分析。
5. 设置流式细胞仪的阴性对照时，需使用仅含检测缓冲液、且未经过染色处理的细胞样品作为对照。Calcein的最大激发光波长为494nm，最大发射光波长为517nm。

结果说明：

- A. 仅含Calcein AM：线粒体和细胞质均有绿色荧光，荧光信号较强；
 - B. 含Calcein AM和CoCl₂：仅线粒体有绿色荧光，荧光强度中等；
 - C. 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无。
- 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，部分Calcein从线粒体内释放，同时钴离子进入线粒体内，引起Calcein绿色荧光发生淬灭。

注意事项

1. 本试剂盒含有荧光试剂，需要避光保存。
2. Calcein AM (1000×)不可反复冻融。如不能一次使用完，请注意分装保存。
3. CoCl₂有腐蚀性、致畸致癌毒性，对人体有呼吸道、生殖等特定器官有毒性，请小心操作，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。CoCl₂对水生生物有毒或有害，请勿直接排入环境。
4. 本产品仅用于科研，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。
5. 实验过程中请穿实验服并佩戴手套及口罩操作。