

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F064

产品规格: 48T/96T

检测仪器: 流式细胞仪/荧光显微镜(FITC)

## Elabscience®线粒体通透性转换孔 (mPTP)

### 荧光法测试盒

Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP)

Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测细胞线粒体通透性转换孔(mPTP)开放程度的变化。

## 检测原理

线粒体是细胞的能量中心，同时在细胞凋亡和坏死性细胞死亡过程中有着非常重要的作用。线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP), 又称线粒体巨型通道(mitochondrial megachannel, MMC), 是一种由线粒体膜内膜和外膜组成的非特异性的通道, 在细胞死亡过程中参与线粒体内物质的释放。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。

本试剂盒的检测原理如下: 试剂盒使用 Calcein AM 染色细胞使细胞质包括线粒体等呈现强绿色荧光。在生理 pH 条件下 Calcein 和  $\text{Co}^{2+}$  络合时, 荧光信号会发生淬灭, 正常情况下线粒体的 mPTP 是关闭的, 此时  $\text{Co}^{2+}$  不能进入线粒体会导致仅线粒体内呈现绿色荧光。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  $\text{Ca}^{2+}$  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,  $\text{Ca}^{2+}$  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。作为对照用钙离子载体离子霉素(Ionomycin)进一步处理以诱导细胞外的  $\text{Ca}^{2+}$  大量进入细胞内和线粒体基质并导致 mPTP 的开放会使线粒体中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。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	探针(500×) (Probe)(500×)	0.03 mL×1 支	0.06 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	淬灭剂(25×) (Quencher)(25×)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	离子霉素(200×) (Ionomycin)(200×)	0.05 mL×1 支	0.1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**流式细胞仪或荧光显微镜(FITC)、恒温培养箱

**试剂：**PBS(0.01 M, pH 7.4)、无酚红基础培养基

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25°C)。

② 探针工作液的稀释：

探针的配制浓度推荐1×(按照探针：PBS = 1：499的体积比稀释)，通常此时的荧光效果比较好。探针的浓度也可以根据实验中所使用细胞的种类和仪器的灵敏度进行适当优化，以摸索出最佳的染色效果，可在1×~2.5×之间进行调整。现配现用，避光置于冰盒上保存，当天使用有效。

③ 淬灭剂工作液的稀释：

淬灭剂的配制浓度推荐1×(按照淬灭剂：PBS = 1：24的体积比稀释)，通常此时的淬灭荧光效果比较好。淬灭剂的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0.15×~2.5×之间进行调整。稀释后的淬灭剂工作液-20°C避光可保存2天。

④ 离子霉素工作液的稀释：

离子霉素的配制浓度推荐 $1\times$ (按照离子霉素: PBS = 1: 199的体积比稀释), 通常此时的实验效果比较好。离子霉素的浓度也可以根据实验中所使用细胞的种类进行适当优化, 以摸索出最佳的实验效果, 可在 $0.1\times$ -  $1\times$ 之间进行调整。稀释后的离子霉素工作液, 分装后 $-20^{\circ}\text{C}$ 避光可保存2天。

## 实验关键点

1. 探针容易淬灭, 注意避光保存和操作, 以减缓荧光淬灭。
2. 探针需避免反复冻融, 可分装后 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。
3. 加入细胞孔的试剂都需要 $37^{\circ}\text{C}$ 预热后使用。

## 操作步骤

**悬浮细胞：**收集细胞，4°C，400 × g 离心 5 min，弃去上清液，用无酚红基础培养基重悬细胞，建议细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/mL，如  $2 \times 10^5$  个细胞，用 1 mL 无酚红基础培养基重悬。设计空白对照、阴性对照、样本和阳性对照，每管加入 200  $\mu$ L 细胞悬液。

① 空白对照：加入 30  $\mu$ L 无酚红基础培养基。

阴性对照：加入 10  $\mu$ L 探针工作液和 20  $\mu$ L 无酚红基础培养基。

样本：加入 10  $\mu$ L 探针工作液，10  $\mu$ L 淬灭剂工作液和 10  $\mu$ L 无酚红基础培养基。

阳性对照：加入 10  $\mu$ L 探针工作液，10  $\mu$ L 淬灭剂工作液和 10  $\mu$ L 离子霉素工作液。

② 于 37°C 培养箱避光孵育 30-60 min 后(不同的细胞最佳孵育时间有所不同。以 30 min 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)。400 × g 室温离心 5 min，弃上清，缓慢加入 37°C 预热的无酚红基础培养基重悬细胞。重复上述离心换液步骤两次后更换新的 37°C 预热的无酚红基础培养基。

③ 于 37°C 培养箱避光孵育 10-30 min(不同的细胞最佳孵育时间有所不同。以 10 min 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)，孵育结束后用荧光显微镜观察或流式细胞仪检测。

## 操作表

	空白对照	阴性对照	样本	阳性对照
细胞悬液( $\mu$ L)	200	200	200	200
无酚红基础培养基( $\mu$ L)	30	20	10	--
探针工作液( $\mu$ L)	--	10	10	10
淬灭剂工作液( $\mu$ L)	--	--	10	10
离子霉素工作液( $\mu$ L)	--	--	--	10

于 37°C 培养箱孵育 30-60 min 后(不同的细胞最佳孵育时间有所不同。以 30 min 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)，400 × g 室温离心 5 min，吸除上清液，缓慢加入 37°C 预热的无酚红基础培养基重悬细胞。重复上述离心换液步骤两次后更换新的 37°C 预热的无酚红基础培养基。

于 37°C 培养箱再避光孵育 10-30 min(不同的细胞最佳孵育时间有所不同。以 10 min 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), 孵育结束后用荧光显微镜或流式细胞仪观察。

**贴壁细胞:** 以 24 孔板为例, 根据实验要求设置细胞板孔, 确保细胞健康且不会过度生长。小心吸出培养基, 避免细胞脱落, 每孔加入 500  $\mu$ L 无酚红基础培养基。

① 空白对照: 加入 75  $\mu$ L 无酚红基础培养基。

阴性对照: 加入 25  $\mu$ L 探针工作液和 50  $\mu$ L 无酚红基础培养基。

样本: 加入 25  $\mu$ L 探针工作液, 25  $\mu$ L 淬灭剂工作液和 25  $\mu$ L 无酚红基础培养基。

阳性对照: 加入 25  $\mu$ L 探针工作液, 25  $\mu$ L 淬灭剂工作液和 25  $\mu$ L 离子霉素工作液。

② 于 37°C 培养箱避光孵育 30-60 min 后(不同的细胞最佳孵育时间有所不同。以 30 min 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), 吸除培养基, 缓慢加入 37°C 预热的无酚红基础培养基。重复上述吸除换液步骤两次后更换新的 37°C 预热的无酚红基础培养基。

③ 于 37°C 培养箱避光孵育 10-30 min(不同的细胞最佳孵育时间有所不同。以 10 min 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), 孵育结束后用荧光显微镜观察或消化收集后使用流式细胞仪检测。

## 操作表

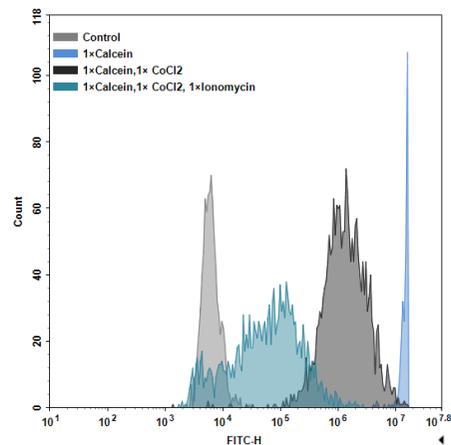
	空白对照	阴性对照	样本	阳性对照
无酚红基础培养基( $\mu$ L)	500	500	500	500
无酚红基础培养基( $\mu$ L)	75	50	25	--
探针工作液( $\mu$ L)	--	25	25	25
淬灭剂工作液( $\mu$ L)	--	--	25	25
离子霉素工作液( $\mu$ L)	--	--	--	25

于 37°C 培养箱避光孵育 30-60 min 后(不同的细胞最佳孵育时间有所不同。以 30 min 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), 吸除培养基, 缓慢加入 37°C 预热的无酚红基础培养基。重复上述吸除换液步骤两次后更换新的 37°C 预热的无酚红基础培养基。

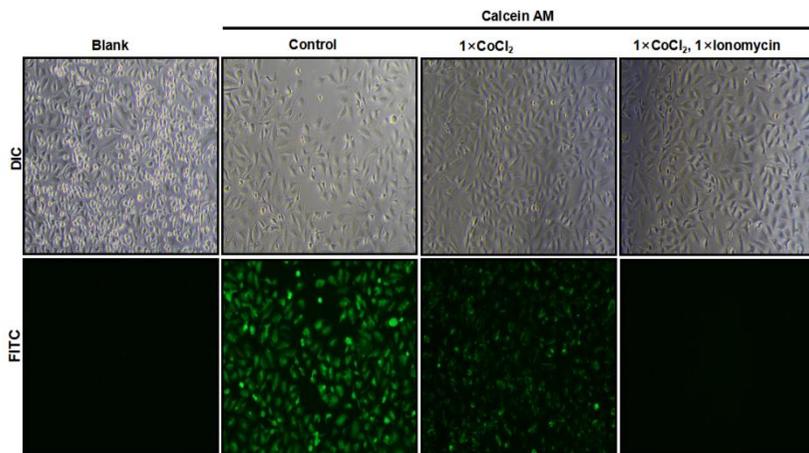
于 37°C 培养箱避光孵育 10-30 min(不同的细胞最佳孵育时间有所不同。以 10 min 作为初始孵育时间, 根据所用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳效果), 孵育结束后用荧光显微镜观察或消化收集后使用流式细胞仪检测。

## 附录1 关键数据

### ①293T 细胞流式细胞仪数据:



### ②Hela 细胞荧光显微镜数据:



探针工作液(1x)与 HeLa 细胞进行孵育, 细胞质包括线粒体发出强绿色荧光; 细胞进一步与淬灭剂工作液(1x)孵育以后, 细胞质内 Calcein 的绿色荧光被淬灭, 仅留下线粒体内的绿色荧光; 使用离子霉素工作液(1x)处理细胞, 诱导细胞外的 Ca<sup>2+</sup>大量进入细胞内, 过多的 Ca<sup>2+</sup>进入线粒体基质, mPTP 开

放,使部分 Calcein 从线粒体内释放,同时使  $\text{Co}^{2+}$  进入线粒体内并导致 Calcein 的绿色荧光淬灭。

## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。



