MitoBright Deep Red Probe Assay Kit

Cat. No: E-CK-A403 **Size:20Assays/100Assays**

产品编号	产品名称	20 Assays	100 Assays	Storage
E-CK-A403A	MitoBright Deep Red Probe Powder	1.5 μg	1.5 μg × 5	-20 ℃, shading light
E-CK-A403B	MitoBright Deep Red Probe Solvent	20 μL	100 μL	-20 ℃, shading light
	说明书		1 份	

保存条件

MitoBright Deep Red Probe Powder 和 MitoBright Deep Red Probe Solvent 可在-20 ℃ 避光保存 1 年有效。

检测原理

Elabscience®自主研发的 MitoBright Deep Red Probe Assay Kit 是用于标记活细胞线粒体并激发深红色荧光（Ex=644 nm，Em=665 nm）的一种线粒体检测试剂盒。MitoBright Deep Red Probe 是一种亲脂性的深红色荧光探针，具有细胞膜渗透性，可通过被动扩散穿过活细胞的细胞膜，从而在线粒体内富集，具有膜电位依赖性。该探针染色稳定，探针染色后，可根据后续实验需求进行固定（醛类固定剂）和透化（醛类去污剂如 Triton X-100），固定后荧光强度会有轻微的下降。

检测样本类型

√贴壁细胞

√悬浮细胞

自备试剂耗材及仪器

- **试剂**

  75%乙醇，细胞基础培养基，无菌 PBS 缓冲液，多聚甲醛固定液，活细胞专用抗荧光淬灭封片剂等。

- **仪器**

  水平离心机，CO_2 培养箱，荧光显微镜，流式细胞仪，生物安全柜等。

- **耗材**

  细胞培养皿，移液器，细胞爬片，载玻片等

实验操作指南

➢ 试剂准备

MitoBright Deep Red Probe 保存液（200 μM）的配制：取出 MitoBright Deep Red Probe Powder，12000 rpm 离心 1 min，使干粉聚于管底，每管 1.5 μg 干粉加入 13.8 μL MitoBright Deep Red Probe Solvent，轻轻吹打混匀，充分溶解后进行分装，-20 ℃ 避光保存，即为 200 μM 的 MitoBright Deep Red Probe 保存液。

➢ 荧光显微镜检测流程

a) 小心吸除贴壁细胞的培养基，每孔加入 1 mL 的 PBS 缓冲液洗涤细胞，去除 PBS 缓冲液。

b) 配制 MitoBright Deep Red Probe 染色工作液（200 nM）的配制：取出 MitoBright Deep Red Probe 保存液，用基础培养基(根据检测细胞选择对应的细胞基础培养基)进行稀释（1:1000）（现配现用），根据单次实验用量，按照 96 孔板 100 μL/孔和 24 孔板 500 μL/孔，参考下表配制足量的染色工作液（200 nM）：

组分	MitoBright Deep Red Probe 染色工作液（200 nM） 体积		
MitoBright Deep Red Probe 保存液（200 μM）	0.5 μL	1 μL	2 μL
细胞基础培养基	500 μL	1000 μL	2000 μL

注：每次实验建议设置阴性对照，阴性对照为细胞基础培养基重悬，且不加 MitoBright Deep Red Probe 的空白细胞。

c) 按照 24 孔板每孔 500 μL 的比例加入 MitoBright Deep Red Probe 染色工作液（200 nM），37 ℃ 孵育 30 min。

d) 小心吸除染色工作液，每孔加入 1 mL 的 PBS 缓冲液，浸洗细胞 3~5 min，去除 PBS 缓冲液，加入 500 μL PBS 缓冲液浸润细胞。

e) 直接在倒置荧光显微镜下观察并拍照。（MitoBright Deep Red Probe 探针为深红色荧光，Ex/Em = 644 nm/665 nm）。

f) 贴壁细胞若提前贴附在玻璃爬片上，染色后可小心取出细胞爬片，置于载玻片上，使用活细胞专用抗荧光淬灭封片剂封片后使用正置荧光显微镜进行观察并拍照。

注：细胞爬片取出拍照时需要保持细胞湿润，可选用活细胞适用的抗荧光淬灭封片剂封片后再进行观察。

g) 若是悬浮细胞，则收集细胞沉淀后，按照 1~5×10^5 个细胞加入 500 μL MitoBright Deep Red Probe 染色工作液（200 nM）重悬细胞沉淀，37 ℃ 避光孵育 30 min，加入 1 mL PBS 缓冲液，300×g 离心 5 min 洗涤细胞后，去除上清，取 10~20 μL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，滴加细胞悬液在载玻片上，轻轻盖上盖玻片即可在荧光显微镜下观察拍照。

注：

a） 染色工作液建议现配现用，当天内使用完毕。

b） 荧光显微镜拍照时，光强过强易猝灭，可适当降低光强，或用多聚甲醛固定液在室温避光固定 20 min 后，再用活细胞适用的抗荧光淬灭封片剂封片后进行观察拍照。固定后的样本使用 PBS 浸润后，4℃避光保存 3 天，荧光亮度稳定不变。

➢ 流式细胞仪检测流程

a) 收集细胞，室温 300×g 离心 5 min，去除上清，加入 1 mL 基础培养基重悬细胞沉淀，室温 300×g 离心洗涤 5 min，去除上清。

b) MitoBright Deep Red Probe 染色工作液（5 nM）的配制：由于流式细胞仪检测具有较高的灵敏度，MitoBright Deep Red Probe 染色工作液（200 nM）需要进一步稀释至 5 nM，取出 MitoBright Deep Red Probe 染色工作液（200 nM），用基础培养基进行稀释（现配现用），按照 1~5×10^5 个细胞/500 μL，根据单次实验用量，配制足量的染色工作液（5 nM）：

组分	MitoBright Deep Red Probe 染色工作液（5 nM） 体积			
MitoBright Deep Red Probe 染色工作液（200 nM）	12.5 μL	25 μL	50 μL	100 μL
细胞基础培养基	487.5 μL	975 μL	1950 μL	3900 μL

注：每次实验建议设置阴性对照，阴性对照为细胞基础培养基重悬，且不加 MitoBright Deep Red Probe 的空白细胞。

c) 每组 1~5×10^5 个细胞，加入 500 μL MitoBright Deep Red Probe 染色工作液（5 nM），轻轻吹打混匀，37 ℃ 二氧化碳培养箱避光孵育 15~20 min。

d) 孵育好的细胞每组加入 1 mL PBS 缓冲液，轻轻吹打混匀，室温 300×g 离心 5 min，弃上清。

e) 每组加入 1 mL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，轻轻吹打混匀，室温 300×g 离心 5 min，弃上清。

f) 100~200 μL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，使用流式细胞仪上机检测，若来不及检测，建议避光置于 4 ℃ 冰箱，1 h 内检测完毕。

注：

a） 流式细胞仪检测 MitoBright Deep Red Probe，可使用 APC 检测通道；

b） 和其他抗体等试剂共染时，可将染色后的细胞使用 4%的甲醛或多聚甲醛固定液在室温避光固定 30 min，离心洗涤后再检测；

c） 固定后的线粒体荧光亮度有所下降，为保持最佳的检测分辨率，需要固定的样本可将 MitoBright Deep Red Probe 染色工作液的浓度增加至 5~10 nM。

结果展示

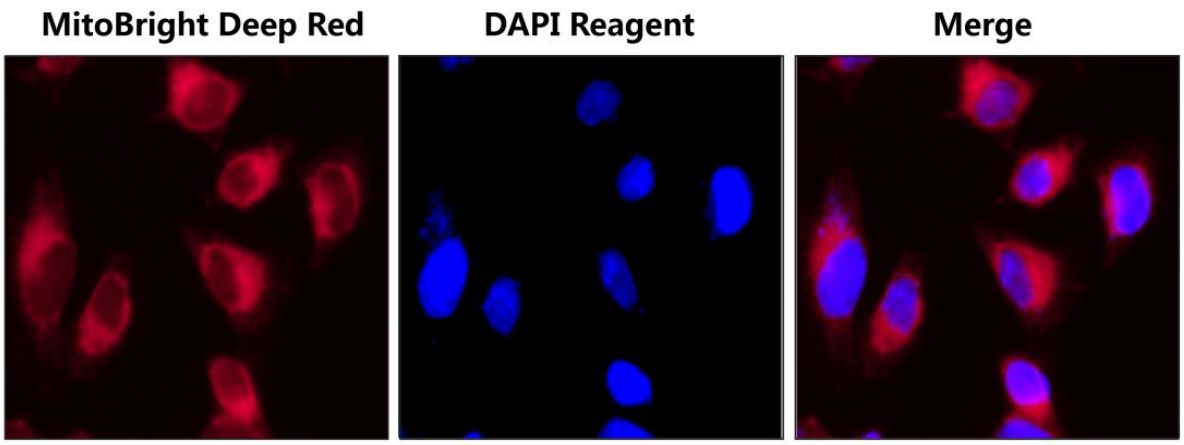

图 1. HELA 细胞检测 MitoBright Deep Red Probe 和 DAPI Reagent(25 μg/mL)(E-CK-A163)共染，并使用荧光显微镜观察并拍照。

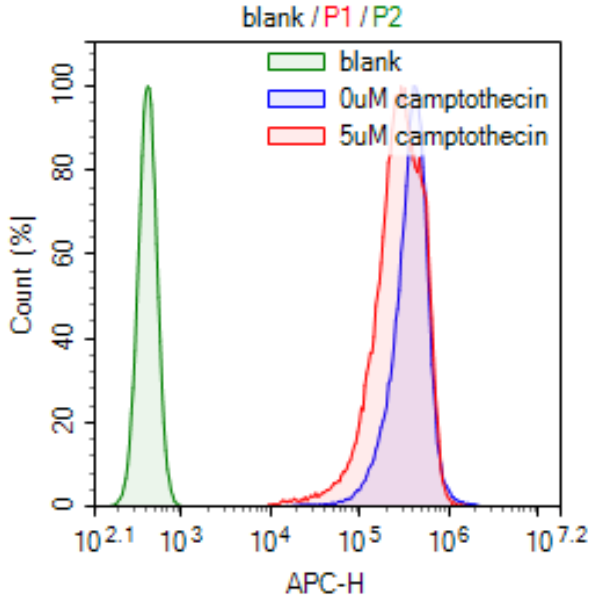

图 2（左）.使用 0/5 μM 的 camptothecin 诱导 Jurkat 细胞 4h 后，收集细胞用 MitoBright Deep Red Probe（E-CK-A403A）标记染色，流式分析结果：和无 camptothecin 的 Control 组正常细胞相比，随着细胞凋亡增强，线粒体膜电位下降，MitoBright Deep Red Probe 荧光亮度降低。

注意事项

1. 本产品仅供科研使用。
2. 为了您的安全与健康，请穿戴实验室工作服和一次性手套进行操作，并遵守实验室试剂操作规程。
3. 本产品用于活细胞内的完整线粒体标记，不可用于固定后的细胞染色，但探针染色后可固定，荧光强度存在一定程度的下降。
4. 本产品中的 MitoBright Deep Red Probe Powder 干粉状态更稳定，加入 MitoBright Deep Red Probe Solvent 溶解后，建议分装后密封避光保存，尽量在 6 个月内使用完毕，避免反复冻融。