

线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoNeoD)

产品编号	产品名称	包装
S0062S	线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoNeoD)	20-200次
S0062M	线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoNeoD)	100-1000次

产品简介:

- 碧云天的线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoNeoD) (Mitochondrial Superoxide Assay Kit with MitoNeoD)是一种以MitoNeoD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。与基于MitoSO™ Red (也称MitoSox Red)的线粒体超氧化物检测试剂盒(如S0061)相比，MitoNeoD染色定位更精准，仅线粒体呈现荧光强度变化，而使用MitoSO™ Red的情况下，线粒体和细胞核的荧光都会发生变化。
- 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[1-3]。
- MitoNeoD，也称MND、Mito-NeoD、Mito Neo D、Mito Neo-D，CAS号为2375088-89-2，分子量为853.99，分子式为 $C_{53}H_{62}DBrN_3P$ ，是一种可快速、特异地靶向线粒体，从而选择性地检测线粒体内的超氧化物的新型荧光探针。MitoNeoD由三部分组成：对 $O_2^{\cdot-}$ 敏感的还原菲啶核心部分，该部分经过修饰可防止DNA嵌入；碳-氘键(C-D)，该部分通过动力学同位素效应(Kinetic isotope effect, KIE)以提高其对 $O_2^{\cdot-}$ 的选择性，从而增强其对超氧化物的选择性；三苯基磷亲脂性阳离子部分，该部分通过线粒体膜电位驱动探针在线粒体基质富集。与MitoSO™ Red (也称MitoSox Red)相比，MitoNeoD具有对线粒体靶向定位更精准、荧光信号更稳定的特点。MitoNeoD与超氧化物反应后不会重新分布，因此仅线粒体中的红色荧光显著增强[4-7]。
- 本试剂盒检测线粒体内超氧化物的原理如图1所示。MitoNeoD的三苯基磷亲脂性阳离子部分，促使其进入活细胞并选择性地靶向进入线粒体，MitoNeoD在线粒体内被超氧化物氧化为MitoNeoOH，并产生强烈的红色荧光，MitoNeoOH激发波长为544nm，发射波长为605nm。

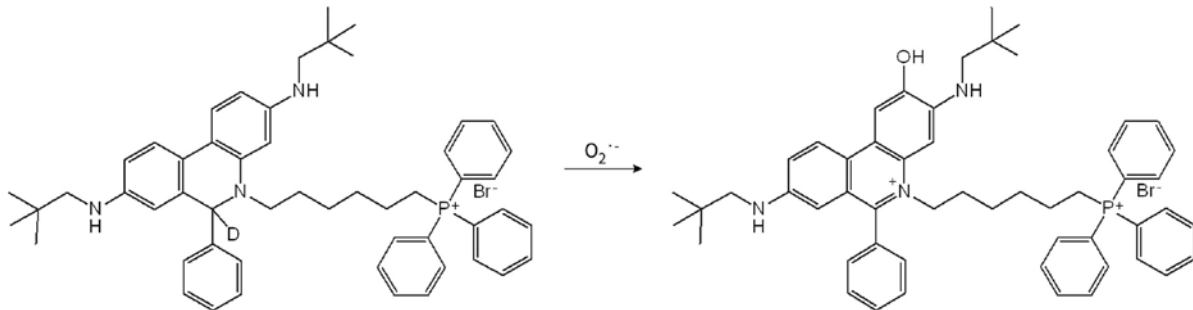


图1. 碧云天线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoNeoD) (S0062)检测原理图。

- 本试剂盒提供的MitoNeoD为10mM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，MitoNeoD的终浓度通常为5-10 μ M，最优先的推荐终浓度为10 μ M。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0.5-2X，最优先的推荐终浓度为1X。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。

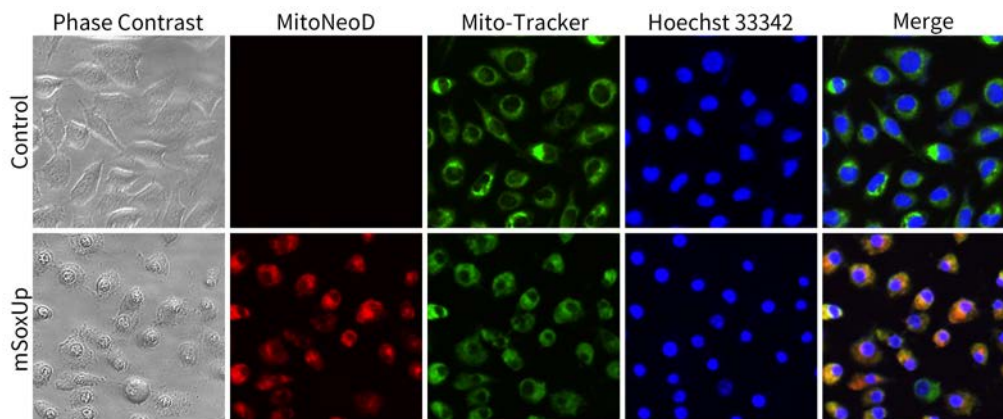


图2. 碧云天线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoNeoD) (S0062)检测L929细胞(小鼠成纤维细胞)线粒体内超氧化物的荧光显微镜效果图。L929细胞不处理或用阳性对照试剂mSoxUp处理后, 使用本试剂盒和Hoechst 33342以及Mito-Tracker Green进行染色。正常的L929细胞中未氧化MitoNeoD, 细胞中红色荧光非常弱, 几乎观察不到红色荧光; 使用诱导线粒体内超氧化物生成的阳性对照试剂mSoxUp处理后, 线粒体内超氧化物生成增加, MitoNeoD与超氧化物反应, 并在线粒体基质富集, 细胞中线粒体的红色荧光显著增强。蓝色荧光为Hoechst 33342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, 可向碧云天订购Hoechst 33342染色液(C1022-C1029)、Mito-Tracker Green (线粒体绿色荧光探针) (C1048)。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。

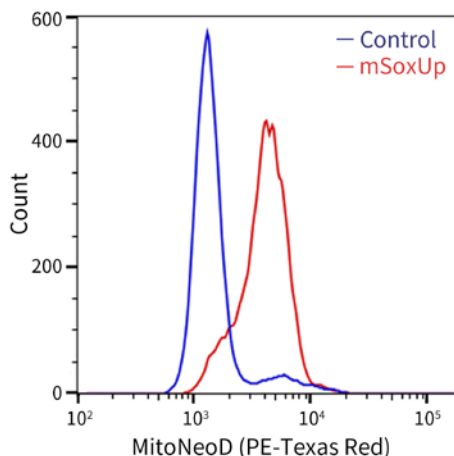


图3. 碧云天线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoNeoD) (S0062)检测L929细胞(小鼠成纤维细胞)线粒体内超氧化物的流式细胞术效果图。L929细胞不处理或用阳性对照试剂mSoxUp处理后, 使用本试剂盒进行染色并进行流式细胞术检测。正常的L929细胞中未氧化MitoNeoD, 细胞中红色荧光非常弱; 使用诱导线粒体内超氧化物生成的阳性对照试剂mSoxUp处理后, 线粒体内超氧化物生成增加, 细胞中的红色荧光显著增强。流式检测荧光通道为PE-Texas Red (Ex/Em=561/610)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 本试剂盒小包装和中包装, MitoNeoD (10mM)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100μl时, 可以分别检测200和1000次。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0062S-1	MitoNeoD (10mM)	20μl
S0062S-2	mSoxUp (1000X)	20μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0062M-1	MitoNeoD (10mM)	100μl
S0062M-2	mSoxUp (1000X)	50μl
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。MitoNeoD (10mM)须避光保存, -80°C保存效果更好。

注意事项:

- BSA和酚红(Phenol red)对本荧光探针的检测有干扰, 需避免。
- 对于特定细胞的检测, 建议先进行预实验, 以确定适当的荧光探针浓度和孵育时间。
- MitoNeoD在激光照射下容易发生淬灭, 因此需要在保证荧光亮度的前提下尽可能降低染料使用浓度, 降低荧光显微镜激发光强度, 缩短拍照时间。
- 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。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板, 推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP965)。
- 第一次使用时请分装成小包装后-20°C保存, 以避免反复冻融。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. MitoNeoD染色工作液的配制。

6孔板每孔所需MitoNeoD染色工作液的量为1ml, 其它培养器皿的MitoNeoD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 MitoNeoD染色工作液。取适量MitoNeoD (10mM), 按照每1 μ l MitoNeoD (10mM)加入1ml PBS (C0221A)的比例稀释MitoNeoD, 混匀后即为MitoNeoD染色工作液。

注1: 配制MitoNeoD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: MitoNeoD染色工作液中MitoNeoD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。MitoNeoD的初始推荐工作浓度为10 μ M, 可以在5-50 μ M范围内摸索最佳工作浓度。如果阳性对照的染色偏弱, 可以适当提高浓度; 如果背景染色偏强, 可以适当降低浓度。对于特定细胞的检测, 建议先进行预实验。

2. 阳性对照的设置。

把试剂盒中提供的mSoxUp (1000X)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MitoNeoD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 (1X)处理4小时后超氧化物含量大量增加, MitoNeoD染色后观察应呈现较强的红色荧光; 而正常的细胞经MitoNeoD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。

a. 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MitoNeoD染色工作液重悬细胞, 使细胞密度为100万-1000万/ml。

b. 细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育10-60分钟, 不同的细胞最佳孵育时间不同。可以以30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。

注: 如果孵育30分钟的染色偏弱, 建议调整为孵育60分钟; 如果孵育30分钟的背景染色偏强, 建议调整为孵育10-15分钟。

c. 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。

d. 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。

e. 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。

a. 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。

b. 加入1ml MitoNeoD染色工作液。细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育10-60分钟, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以30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。

注: 如果孵育30分钟的染色偏弱, 建议调整为孵育60分钟; 如果孵育30分钟的背景染色偏强, 建议调整为孵育10-15分钟。

c. 37 $^{\circ}$ C孵育结束后, 吸除上清, 用PBS洗涤2次。

d. 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, 优先推荐使用碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP965), 分别进行顶读或底读模式进行荧光检测。

5. 参数设置。

MitoNeoD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544nm激发波长、605nm发射波长进行检测, 对于超氧化物更精准的检测, 可以实时、逐时间点或单时间点检测刺激前后荧光的强弱。流式细胞仪推荐使用PE-Texas Red (Ex/Em=561/610)通道或其它合适的通道进行检测。对于普通的荧光显微镜, 可以参考观察红色荧光的设置。

6. 其它说明。

上述推荐的MitoNeoD的初始工作浓度为10 μ M, 对于某些细胞, 如果发现刺激后的阳性对照细胞荧光也比较弱, 可以按照1:200-1:500的比例稀释MitoNeoD, 使装载探针时MitoNeoD的浓度为20-50 μ M。另外, 探针装载的时间也可以根据情况适当进行调整。

参考文献:

1. Jie Z, Liu J, Shu M, Ying Y, Yang H. Talanta. 2022. 1(236):122892.
2. Holmström KM, Finkel T. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014. 15(6):411-421.
3. Fridovich I. Aging Cell. 2004. 3(1):13-16.
4. Horobin RW, Stockert JC, Rashid-Doubell F. Histochem Cell Biol. 2013. 139(5):623-37.
5. Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2005. 102(16):5727-32.
6. Michalski R, Zielonka J, Hardy M, Joseph J, Kalyanaraman B. Free Radic Biol Med. 2013. 1(54):135-47.
7. Shchepinova MM, Cairns AG, Prime TA, Logan A, et al. Cell Chem Biol. 2017. 24(10):1285-1298.e12.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C2055	BODIPY 500/510 C1, C12(脂肪酸绿色荧光探针)	1mg/5mg/25mg
S0019	DAF-FM DA (NO荧光探针)	>100次/>500次

S0033	活性氧检测试剂盒	>100次/>500次
S0034	活性氧检测试剂盒(含稀释液)	>100次/>500次
S0035	活性氧检测试剂盒(CM-H ₂ DCFDA)	20-200次/100-1000次
S0036	活性氧检测试剂盒(CM-H ₂ DCFDA, 含稀释液)	20-200次/100-1000次
S0038	过氧化氢检测试剂盒	150次
S0043	脂质过氧化检测试剂盒(BODIPY 581/591 C11)	100-1000次/500-5000次
S0051	过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0060	超氧化物检测试剂盒	100次
S0061	线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSO™ Red)	20-200次/100-1000次
S0062	线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoNeoD)	20-200次/100-1000次
S0063	Dihydroethidium (超氧化物阴离子荧光探针)	5mg
S0064S	超氧阴离子活性氧检测试剂盒(DHE)	100-1000次
S0067-100μg	SOSG (单线态氧绿色荧光探针)	100μg
S0068S	单线态氧检测试剂盒(SOSG)	30-300次
S0131	脂质氧化(MDA)检测试剂盒	100次/500次

Version 2025.04.01