

Mitochondrial Permeability Transition Pore Assay Kit (flow cytometry)线粒体膜通透性转换孔检测试剂盒（流式分析）

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Mitochondrial Permeability Transition Pore Assay Kit (flow cytometry) 线粒体膜通透性转换孔检测试剂盒（流式分析）	40756ES60	100 T

产品描述

线粒体膜通透性转换孔（mitochondrial permeability transition pore, mPTP），又称线粒体巨型通道（magachannel），是存在于线粒体内外膜之间的非选择性高导电性通道，由多种蛋白质复合组成。线粒体通透性转换孔（mPTP）可能参与了细胞死亡过程中线粒体成分的释放。

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 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， 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。

线粒体膜通透性转换孔检测试剂盒（流式分析）检测方法是一种相对于仅基于线粒体膜电位分析更直接的检测线粒体通透性转换孔开放的检测方法。其原理是：首先通过被动运输加载 Calcein AM，后者是一种对活细胞进行荧光标记的细胞染色试剂，能够轻易穿透活细胞膜，被细胞内的酯酶剪切形成膜非渗透性的极性分子 Calcein，从而被滞留在细胞内，使胞质包括线粒体发出强绿色荧光。加入 $CoCl_2$ 后，来自胞质的荧光被 $CoCl_2$ 淬灭，仅留下线粒体内的荧光。作为对照，可将细胞加载 Calcein AM 和 $CoCl_2$ 的同时，对其用离子霉素处理，从而使细胞加载更多的 Ca^{2+} ，引起线粒体通透性转换孔的激活从而使线粒体荧光淬灭。

本试剂盒以 1ml 标记体系计算，可供 100 次检测。检测最大激发波长 494 nm，最大发射波长 517 nm。

产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格
40756-A	Calcein AM	5×50 μg
40756-B	DMSO	250 μL
40756-C	$CoCl_2$ (80 mM)	1.2 mL
40756-D	Ionomycin(100μM)	750 μL
40756-E	Cell Stain Buffer	2×250 mL

运输和保存方法

冰袋运输。-20℃避光干燥保存，避免反复冻融，有效期至少 12 个月。

注意事项

- 1) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 2) 本产品仅作科研用途！

使用方法

为了达到最佳实验效果，需针对不同的细胞类型、细胞培养条件等进行调整优化。本品还可配套其他探针一起操作。

1、 1mM Calcein AM 储存液制备

取出试剂并回温至室温，吸取 50 μ L DMSO 溶解 1 管 Calcein AM，混匀后避光保存。

【注】：钙黄绿素一旦溶解后，建议设置一系列实验将其短时间内用完，不能长期保存钙黄绿素溶液。

2、细胞染色（流式分析）

1) 用本试剂盒含有的 Cell Stain Buffer 将细胞制备成单细胞悬液，使其密度为 1×10^6 细胞/mL。

【注】：① 用于离子霉素对照样品的缓冲液必须含有 Ca^{2+} ；

② 钙黄绿素加载时不能含有血清；

③ 细胞必须为单细胞悬液。

2) 按照 1ml 每管将细胞悬液等分，每个样品等分成 3 份。

后续染色顺序：1 号管仅含钙黄绿素，2 号管含钙黄绿素和 CoCl_2 ，3 号管含钙黄绿素， CoCl_2 和离子霉素，另外准备一管不含试剂的细胞样品用于相应的仪器设置。

3) 用 Cell Stain Buffer 1:500 稀释 1 mM Calcein AM 储存液，制备成 2 μ M 的工作液，例如取 5 μ L 1mM 储存液加入 2.5 mL Cell Stain Buffer，混匀即可。

4) 向上述每个样品的 3 管中分别加入 5 μ L Calcein AM 工作液并混匀。

5) 向 2 号、3 号管中加入 5 μ L CoCl_2 ，并混匀。

6) 向 3 号管中加入 5 μ L Ionomycin (100 μ M)，并混匀。

7) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。

8) 向每管中加入 3.5 mL Cell Stain Buffer，离心收集细胞。

【注】：此步可去除多余染料以及可能引起荧光淬灭的试剂。

9) 用 400 μ L 同时可用于流式检测的合适的缓冲液重悬细胞团。

如果需要，也可进行进一步染色。如用标记的 Annexin V 检测磷脂酰丝氨酸易位；用 PI 检测细胞活力；或者用 MitoTracker 红色探针检测线粒体活力等。注意整个过程均需避光操作。

10) 染色后，将样品置于冰上，1 h 内进行流式分析。

11) 用不含试剂的细胞样品进行相应的仪器设置。用流式 488 激发器进行荧光分析，Calcein AM 最大激发波长 494 nm，最大发射波长 517 nm。

1 号管-仅含钙黄绿素：线粒体和胞浆有荧光，荧光信号较强；

2 号管-含钙黄绿素和 CoCl_2 ：仅线粒体呈现荧光，荧光强度居中；

3 号管-含钙黄绿素， CoCl_2 和离子霉素：线粒体和胞浆荧光均被淬灭，荧光信号最弱。

2 号管和 3 号管荧光信号的变化说明线粒体通透性转换孔被不断的激活。