

## 产品组成:

| 规格                               | 1000-2000T |
|----------------------------------|------------|
| 试剂 A : BBcellProbe™ 线粒体红色荧光M11染料 | 100ul      |
| 试剂 B: 染料稀释液                      | 10ml       |

## 储存条件:

染料-20℃避光保存; 避免反复冻融;  
稀释液 2-8℃保存

## 有效期:

六个月。

## 产品简介:

BBcellProbe™ M11 线粒体染色试剂盒是利用 BBcellProbe™ M 系列探针进行线粒体特异性染色的试剂盒。本试剂盒中的 BBcellProbe™ M11 线粒体染色探针为红色荧光标记的线粒体探针, 具有 579/599nm 的最大激发/发射波长。本品适合双标实验, 因其红色荧光与其他的绿色荧光探针具有良好的分辨率。

BBcellProbe™ M 系列探针是一种细胞渗透型的对活细胞中的线粒体体进行选择染色的一类新型荧光染料, 该系列探针可以选择性标记线粒体, 包含标记线粒体的弱巯基反应性的氯甲基官能团。只需简单孵育细胞, 即可穿过细胞膜并直接聚集在活性线粒体上。可有效标记活细胞。一旦线粒体被染色后, 还能根据后续实验的需求进行固定(醛类固定剂如甲醛)和透化(醛类去污剂如 Triton X-100), 探针依然维持在细胞内。

虽然传统的线粒体荧光探针如 TMR 和罗丹明 123, 也能很容易的聚集在功能线粒体上, 但是一旦线粒体膜电位丧失即会被洗掉, 从而在一些需要细胞进行醛类固定或者包含线粒体能量状态影响因子的实验中, 使其应用大受限制, 而 BBcellProbe™ M 系列探针不受线粒体膜电位影响。

BBcellProbe™ M 系列线粒体探针具有多种颜色可以选择, 可根据情况对样品进行多色标记实验。除了本试剂盒的红色荧光探针, 还可以提供绿色、蓝色、橙色等颜色的染色试剂盒。

## 试剂盒以外自备试剂和仪器:

PBS HBSS 离心机 荧光显微镜/激光共聚焦显微镜

## 使用方法:

### 使用注意事项:

- 1) M11 染色液为 DMSO 溶液, 冬季气温较低时在室温时为凝固状态, 极易粘附在管壁、吸头壁。注意需要加热溶解, 吸头也需要放在培养箱预热, 否则容易再次凝固在吸头内壁产生损耗。
- 2) 使用前, 先将本品取出回温至室温, 并对其进行简短离心使 DMSO 溶液集中于管底。
- 3) 细胞处理需要小心操作, 尽量避免人为的损伤细胞。
- 4) 标记的条件因细胞种类而异, 根据同样本的实际染色结果做相应调整, 在每次实验前, 请先根据不同的实验要求、细胞类型、细胞的膜通透性等进行优化, 确定最佳条件。以下方法仅供参考。
- 5) 染色后立即进行分析。

### 1. 染色工作液配制:

根据样本数量, 用染料稀释液将 BBcellProbe™ M11 荧光染料 100 倍稀释, 再用相应的培养基或者 HBSS 缓冲液 20-400 倍稀释(对于后续需要做固定或透化的样本, 20-100 倍稀释), 配制成染色工作液。

注:

- 1) 也可以直接用相应的培养基或 HBSS 等缓冲液稀释 M11 染料母液至所需浓度。
- 2) 建议收到产品后, 根据单次使用量, 对母液进行小量分装, 每次使用一管, 试剂-20℃避光冻存, 一年稳定。
- 3) 开始实验前, 使用培养基或 HBSS 缓冲液稀释储存液到需要的工作浓度。工作浓度为根据不同细胞的预实验结果确定的最佳工作浓度, 一般染色终浓度 2000-40000 倍稀释。
- 4) 为了降低过度加载染料导致的潜在背景和线粒体毒性, 在不影响实验结果的前提下应尽可能低浓度染色。另外, 浓度过高也可能造成非特异性染色, 对其他细胞结构进行染色。
- 5) 工作液现配现用。
- 6) 为了降低探针加载过度可能引起的假阳性, 建议在不影响染色效果的情况下尽量使用低浓度。

## 2. 细胞染色

### 2.1 对于贴壁细胞

- 1) 培养皿/培养板准备细胞样本。
- 2) 待细胞生长到合适丰度, 吸除培养液, 加入适量 37℃预热的含探针工作液。于生长状态下孵育 15 分钟~45 分钟 (具体孵育时间需根据细胞类型而定, 需预实验优化)。

注:

- 也可以将细胞置于培养皿中的盖玻片上, 加入合适培养基, 使其爬片生长。

- 3) 利用新鲜培养基替换上述染色液。

注:

- 若染色不够充分, 建议增加染料浓度或延长染色时间。
- 4) 荧光显微镜 (含合适滤片) 或流式细胞仪、荧光酶标仪下观察。最大激发/发射波长为 579 / 599nm。或者进行后续的固定和透化步骤。

### 2.2 对于悬浮细胞

- 1) 离心, 吸除上清。
- 2) 利用 37℃预热的探针工作液重悬细胞, 于生长状态下孵育 30 分钟~2 小时 (具体时间需根据细胞类型而定, 需预实验优化)。
- 3) 离心, 吸除染色液, 加入新鲜培养液重悬细胞。
- 4) 置于荧光镜下观察。或流式细胞仪、荧光酶标仪检测。最大激发/发射波长为 579/ 599nm。或者进行后续的固定和透化步骤。

注:

- 对于悬浮细胞, 也可将细胞贴附于经细胞粘合剂处理过的盖玻片上, 然后使用类似于贴壁细胞的方法进行染色。
- 如果需要盖玻片上固定化的细胞, 那么可在铺片前可以先用多聚赖氨酸 (poly-D-lysine) 包被载玻片或盖玻片。
- 若染色不够充分, 建议增加染料浓度或延长染色时间。

## 3. 固定和透化:

- 1) 染色结束后, 利用培养液或缓冲液清洗细胞;
- 2) 小心吸走清洗液。换用新鲜配制且预热的含 2-4% 甲醛的缓冲液或培养液进行细胞固定。
- 3) 清洗细胞: 吸除固定液, 用适当缓冲液冲洗细胞数次。
- 4) 细胞透化 (可选):  
ICC 等实验需要细胞要做透化, 可将已固定的细胞直接加入含有去污剂如 Triton X-100 的缓冲液中孵育。透化结束后, 用缓冲液清洗细胞即可进行后续 ICC 实验。一般用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 孵育细胞 10 分钟可以达到良好的透化效果。还可利用预冷的丙酮透化 5 分钟, 之后用 PBS 清洗细胞。经验证, 即使后继没有进一步的抗体标记, 丙酮透化处理也可降低背景信号。