

线粒体钙离子检测试剂盒(Rhod-2 AM)

产品编号	产品名称	包装
S1062S	线粒体钙离子检测试剂盒(Rhod-2 AM)	200次
S1062M	线粒体钙离子检测试剂盒(Rhod-2 AM)	1000次

产品简介:

- 碧云天研发生产的线粒体钙离子检测试剂盒(Rhod-2 AM) (Mitochondrial Calcium Assay Kit with Rhod-2 AM), 也称线粒体钙流检测试剂盒(Mitochondrial Calcium Influx Assay Kit with Rhod-2 AM), 是一种以Rhod-2 AM为荧光探针, 快速灵敏地检测线粒体内钙离子(Ca^{2+})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。
- 钙(Calcium)通常是哺乳动物机体内最为丰富的矿物质, 参与调控众多的细胞生命活动过程, 也是最为重要的细胞内调控因子之一。线粒体钙离子调节多种线粒体功能, 如线粒体内的氧化代谢、ATP合成等, 并参与调控细胞的死亡。线粒体钙离子的适度增加导致柠檬酸循环中相关酶的激活, 从而促进ATP合成; 但线粒体钙离子超载时, 可导致线粒体功能障碍和细胞死亡[1-3]。
- Rhod-2 AM, 也称RHOD 2-AM、RHOD-2 AM、线粒体钙离子荧光探针, CAS号为145037-81-6, 分子量为1124.0, 分子式为 $\text{C}_{52}\text{H}_{59}\text{N}_4\text{O}_{19}\cdot\text{Br}$ 。Rhod-2 AM是Rhod-2的乙酰甲酯衍生物, 具有细胞膜通透性, 进入细胞后可以被细胞内的酯酶催化形成Rhod-2, 从而被滞留在细胞内。由于Rhod-2具有线粒体特异性探针Rhodamine (罗丹明)的主要结构, 从而可以进入线粒体并和线粒体中的钙离子结合, 结合钙离子后在552nm激发光下可以产生强烈的荧光, 因此Rhod-2 AM常用于监测线粒体内的钙离子浓度变化[3-7]。
- Rhod-2有些类似于Fluo-3和Fluo-4, 其激发和发射光谱不会随着钙离子浓度变化发生明显的偏移, 但与Fluo-3和Fluo-4不同的是, Rhod-2可以特异性地检测线粒体内的钙离子变化, 并且Rhod-2的波长更长, 适用于具有高水平自发荧光的细胞和组织中进行钙离子检测实验, 也适用于可见光活化钙离子螯合剂和光感受器产生的钙离子检测。Rhod-2最大激发波长为552nm, 最大发射波长为581nm。Rhod-2与线粒体钙离子结合后的激发光谱和发射光谱参考图1。

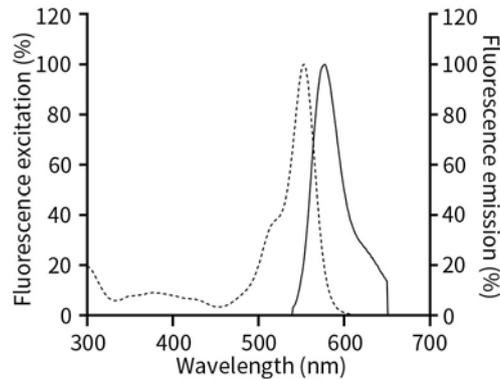


图1. Rhod-2与线粒体钙离子结合后的激发光谱和发射光谱。

- 本试剂盒使用便捷, 提供了多种配套试剂。本试剂盒提供了用于稀释Rhod-2 AM的检测缓冲液(Assay Buffer), 该检测缓冲液可以极大程度地保证细胞活力和接近正常的生长状态; 提供了可增强Rhod-2 AM溶解性的促溶剂(Solubility Enhancer)可以改善染色效果; 提供的染色增强剂(Staining Enhancer)在检测中可有效地维持细胞内荧光并减少背景荧光; 同时, 本试剂盒提供CaUp作为诱导细胞线粒体内钙离子浓度升高的阳性对照。本试剂盒检测细胞线粒体钙离子的效果参考图2。

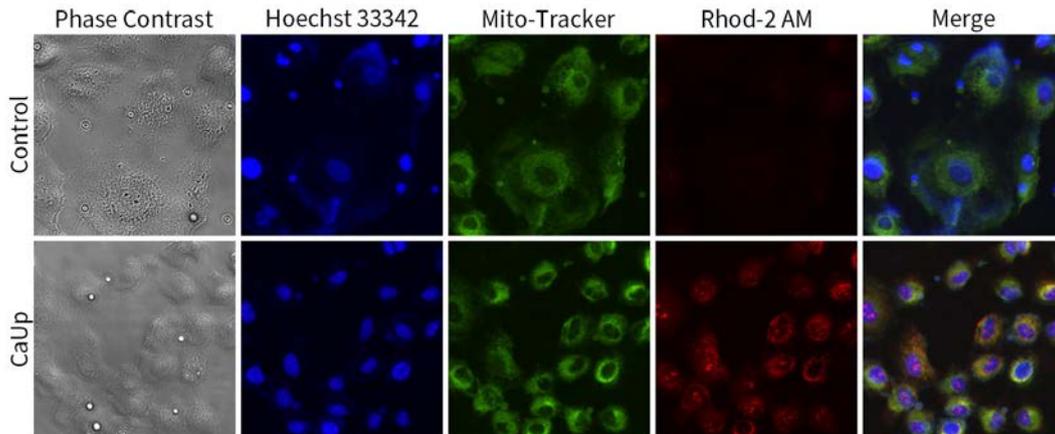


图2. 碧云天线粒体钙离子检测试剂盒(Rhod-2 AM) (S1062)检测NRK-52E细胞(大鼠肾小管上皮细胞)线粒体内钙离子的效果图。NRK-52E细胞不处理或使用阳性对照CaUp处理后, 使用本试剂盒和Hoechst 33342以及Mito-Tracker Green进行染色。正常的NRK-52E细胞中线粒体内钙离子浓度较低, Rhod-2的红色荧光非常弱; 使用CaUp处理30分钟后, 线粒体内钙离子超载, Rhod-2与线粒体内钙离子结合, 红色荧光显著增强。蓝色荧光为Hoechst 33342标记的所有细胞的细胞核, 绿色荧光为Mito-Tracker Green标记的所有细胞的线粒体。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(C1025-C1029)、Mito-Tracker Green (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。

- 对于96孔板中的样品, 按照每孔使用100μl Rhod-2染色液计算, 本试剂盒的小包装和中包装分别可以进行200次和1000次检测; 如果用于流式细胞仪检测, 按照每个样品的检测体系体积为0.5ml时, 本试剂盒的小包装和中包装分别可以进行40次和200次检测; 对于6孔板中的贴壁培养细胞样品, 按照每孔使用1ml Rhod-2染色液计算, 本试剂盒的小包装和中包装分别可以进行20次和100次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S1062S-1	Rhod-2 AM (500X)	40μl
S1062S-2	Solubility Enhancer (500X)	40μl
S1062S-3	Assay Buffer	50ml
S1062S-4	Staining Enhancer (100X)	200μl
S1062S-5	CaUp (500X)	20μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S1062M-1	Rhod-2 AM (500X)	200μl
S1062M-2	Solubility Enhancer (500X)	200μl
S1062M-3	Assay Buffer	250ml
S1062M-4	Staining Enhancer (100X)	1ml
S1062M-5	CaUp (500X)	100μl
—	说明书	1份

保存条件:

除Rhod-2 AM (500X)外, -20°C保存, 一年有效。Rhod-2 AM (500X) -80°C保存。其中Rhod-2 AM (500X)和CaUp (500X)须避光保存。

注意事项:

- 第一次使用时请适当分装后保存, 以避免反复冻融。
- BSA和酚红(Phenol red)对本荧光探针的检测有干扰, 须避免。
- 本试剂盒仅限于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, 但染色后可以固定细胞或组织。
- 荧光酶标仪检测时必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)。
- Rhod-2 AM (500X)和Solubility Enhancer (500X)使用时请确保已完全溶解。
- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 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. Rhod-2染色液(Rhod-2 Staining Solution)的配制。

按照96孔板每孔100μl Rhod-2染色液的体系, 参考下表配制适量的Rhod-2染色液, 并充分混匀。不同多孔板的试剂用量请按比例调整。

Reagent	1 Sample	10 Samples	100 Samples
Rhod-2 AM (500X)	0.2μl	2μl	20μl
Solubility Enhancer (500X)	0.2μl	2μl	20μl
Assay Buffer	99.6μl	996μl	9.96ml
Rhod-2 Staining Solution	100μl	1ml	10ml

注1: 配制好的Rhod-2染色液必须一次性使用完毕, 不能冻存。本试剂盒提供的Rhod-2 AM为500X储存液, 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检测结果, 对于不同类型的细胞请自行进行一定摸索, Rhod-2 AM的终浓度通常为0.5X-2.5X, 最优先的推荐终浓度为1X。另外, Rhod-2 AM浓度的增加很可能会使线粒体发生浓度依赖性的裂变,

导致线粒体特有的长小管断裂，产生圆形的小线粒体[7]。因此建议Rhod-2 AM的工作浓度不超过2.5X，否则可能会改变线粒体形态。

注2：也可以使用其它合适的溶液，如无血清培养液、HBSS (C0218)或PBS (C0221A/C0221D)稀释Rhod-2 AM (500X)。本试剂盒配套提供的检测缓冲液(Assay Buffer)可在一段时间内有效维持细胞的正常状态，并给细胞提供一定的营养，使用效果通常比PBS或HBSS更好。

注3：Staining Enhancer即染色增强剂，对细胞功能可能有一定的影响，对于大多数细胞无需添加。如果遇到细胞出现去酯化的荧光探针Rhod-2明显的外排现象时，则建议添加。使用时将Staining Enhancer (100X)按照1:100稀释到Rhod-2 Staining Solution中，配制成含1X Staining Enhancer的Rhod-2 Staining Solution。细胞在含1X Staining Enhancer的溶液中孵育的时间不能超过2小时。

2. 阳性对照的设置。

把试剂盒中提供的CaUp (500X)推荐按照1:500的比例加入到细胞培养液中，孵育30分钟。随后按照下述方法加入Rhod-2染色液，进行线粒体内钙离子浓度的检测。对于大多数细胞，通常CaUp (1X)处理30分钟后线粒体内钙离子超载，Rhod-2 AM染色后观察应呈现较强的红色荧光；而正常的细胞经Rhod-2 AM染色后应呈现微弱的红色荧光。对于特定的细胞，CaUp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CaUp不敏感而某些细胞却受到损伤。

3. 对于悬浮细胞。

- 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Rhod-2染色液重悬细胞，使细胞密度为100万-1000万/ml。
- 细胞培养箱中37°C孵育10-30分钟，不同的细胞最佳孵育时间不同。以20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。
- 37°C孵育结束后， $600\times g$ 4°C离心3-4分钟，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。
- 用PBS洗涤2次：加入1ml PBS重悬细胞， $600\times g$ 4°C离心3-4分钟，弃上清。再加入1ml PBS重悬细胞， $600\times g$ 4°C离心3-4分钟，弃上清。
- 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。也可以根据实验需要在细胞重悬后加入适当药物处理并进行相应的荧光检测。

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。

- 对于96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。
- 加入100 μ l Rhod-2染色液。细胞培养箱中37°C孵育10-30分钟，不同的细胞最佳孵育时间不同。以20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。
- 37°C孵育结束后，吸除上清，用PBS洗涤2次。
- 加入100 μ l PBS，荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。加入PBS后也可以根据实验需要加入适当药物处理并进行相应的荧光检测。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。

使用552nm激发波长，581nm发射波长，实时、逐时间点或单时间点检测刺激前后荧光的强弱。Rhod-2 AM和钙离子的反应产物的荧光光谱和碘化丙啶(PI)或Cy3丙非常相似，可以用检测Phycoerythrin (PE)的参数设置进行检测。

参考文献：

- Bravo-Sagua R, Parra V, López-Crisosto C, Díaz P, Quest AF, et al. Compr Physiol. 2017. 7(2):623-634.
- Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, Sheu SS. Front Biosci (Landmark Ed). 2009. 14(4):1197-1218.
- Pendin D, Greotti E, Filadi R, Pozzan T. J Endocrinol Invest. 2015. 38(1):39-45.
- Minta A, Kao JP, Tsien RY. J Biol Chem. 1989. 264(14):8171-8178.
- Jean-Quartier C, Bondarenko AI, Alam MR, Trenker M, et al. Mol Cell Endocrinol. 2012. 353(1-2):114-127.
- Kosmach A, Roman B, Sun J, Femnou A, et al. Cell Rep. 2021. 37(3):109846.
- Fonteriz RI, de la Fuente S, Moreno A, Lobatón CD, Montero M, et al. Cell Calcium. 2010. 48(1):61-69.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C1025/C1026	Hoechst 33342染色液	10ml/50ml
C1027	Hoechst 33342活细胞染色液(100X)	0.1ml
C1028	Hoechst 33342活细胞染色液(100X)	0.5ml
C1029	Hoechst 33342活细胞染色液(100X)	3ml
C1032	Mito-Tracker Deep Red FM (线粒体深红荧光探针)	50 μ g/250 μ g
C1034	Mito-Tracker Deep Red 633 (线粒体深红荧光探针)	50 μ g/250 μ g
C1035	Mito-Tracker Red CMXRos (线粒体红色荧光探针, 高纯度)	50 μ g/250 μ g

C1048	Mito-Tracker Green (线粒体绿色荧光探针)	50μg
C2001S	线粒体膜电位检测试剂盒(TMRE)	100-1000次
C2003S	增强型线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)	>100次
C2005	JC-1	1mg
C2006	线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)	>100次
C2008S	线粒体膜电位检测试剂盒(Rhodamine 123)	100-1000次
D2861	pCMV-jGCaMP7b (高亮度钙离子荧光探针)	1μg/100μg
D2863	pCMV-jGCaMP7c (高对比度钙离子荧光探针)	1μg/100μg
D2865	pCMV-jGCaMP7f (快速响应型钙离子荧光探针)	1μg/100μg
D2867	pCMV-jGCaMP7s (高灵敏度钙离子荧光探针)	1μg/100μg
S0061	线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSOX Red)	20-200次/100-1000次
S1052	Fura-2 AM (钙离子荧光探针, 2mM)	50μl
S1056	Fluo-3 AM (钙离子荧光探针, 5mM)	20μl
S1060	Fluo-4 AM (钙离子荧光探针, 2mM)	25μl
S1061	Fluo-4钙离子检测试剂盒	200次/1000次
S1062	线粒体钙离子检测试剂盒(Rhod-2 AM)	200次/1000次

Version 2024.09.27