

概述

MitoPeDPP是一种新型荧光染料，由于其具有三苯基膦结构，因此可以穿过细胞膜并在线粒体中聚集。聚集在线粒体内膜上的MitoPeDPP可以被脂质过氧化物氧化而释放出强荧光。由于氧化的MitoPeDPP (Ox-MitoPeDPP) 的激发和发射波长分别是452 nm和470 nm，可以减小样品的光损伤和自发荧光，因此利用荧光显微镜MitoPeDPP可以检测活细胞中的脂质过氧化物。

* 本产品由福冈大学化学系的Dr. Shioji开发。

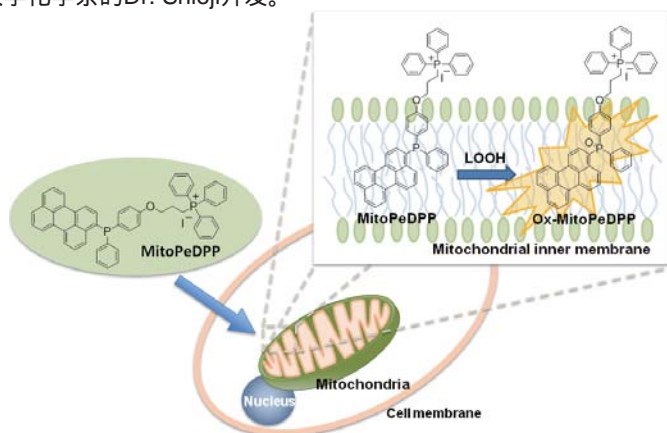


图1. MitoPeDPP的检测原理图

试剂内含

MitoPeDPP 5 μg \times 3

*由于MitoPeDPP量极少不宜看到，可以通过观察MitoPeDPP DMSO溶液的颜色是否为黄色来判断。

储存条件

0-5 $^{\circ}\text{C}$ ，避光保存

*打开后请在0-5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下密封保存。

所需的设备和材料

- Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
- PBS
- Hanks 'HEPES 缓冲液
- 移液器

溶液制备

制备0.1 mmol/l MitoPeDPP DMSO储存液

向含有5 μg MitoPeDPP的管子中加入50 μl DMSO，用移液器吹打使其溶解。

*由于MitoPeDPP在DMSO溶液中不稳定，请避光保存并在1天内用完。

制备MitoPeDPP工作液

用Hanks 'HEPES缓冲液稀释MitoPeDPP DMSO储存液，制备成0.1-0.5 $\mu\text{mol/l}$ 的MitoPeDPP工作液。

* Hanks 'HEPES缓冲液用来维持细胞环境的稳定

* 制备好工作液后立刻加入细胞中以避免MitoPeDPP发生自氧化。

操作步骤

MitoPeDPP染色

1. 准备实验用细胞。
2. 更换培养基，用Hanks 'HEPES或PBS清洗2次。
3. 加入适量的MitoPeDPP工作液。

容器	工作液体积
35 mm 皿	2,000 μl
96孔板	100 μl

4. 在37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养15 min。
5. 弃上清液，然后用Hanks 'HEPES缓冲液或PBS清洗2次。
6. 加入含有刺激剂的Hanks 'HEPES缓冲液或PBS，在荧光显微镜下观察。

* 波长/带通滤波器：470/40 nm (Ex)，525/50 nm (Em)

此操作步骤仅为常规通用方法，请根据实际情况优化实验条件，如MitoPeDPP的合适终浓度、刺激剂的刺激时间等。

1. 检测鱼藤酮产生的脂质过氧化物

1. 在 μ -Slide 8 well (ibidi) 中接种Hela细胞，并在37 °C、5%的CO₂培养箱中过夜培养。
2. 用200 μ l Hanks 'HEPES缓冲液清洗细胞2次。
3. 在 μ -Slide中加入0.1 μ mol/l的MitoPeDPP工作液，在37 °C培养15 min。
4. 用Hanks 'HEPES缓冲液清洗细胞2次。
5. 在 μ -Slide中加入200 μ l Hanks 'HEPES缓冲液，放置到荧光显微镜下。
6. 然后加入200 μ l含有2 μ mol/l鱼藤酮的Hanks 'HEPES缓冲液 (鱼藤酮终浓度为1 μ mol/l)。
7. 在荧光显微镜下持续观察3 h以观察随时间改变的荧光变化情况。

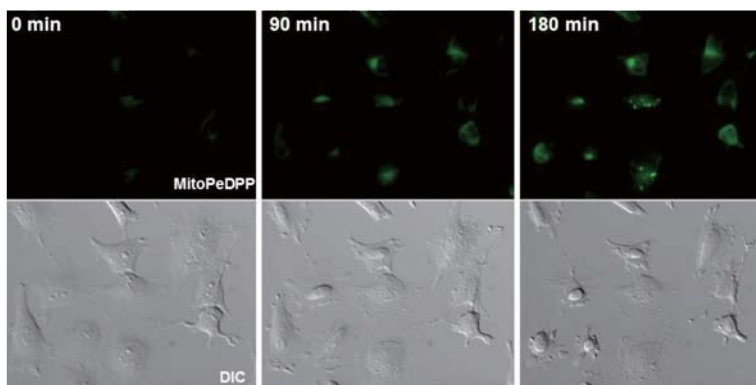


图2. 用鱼藤酮刺激后的Hela细胞荧光成像图
鱼藤酮的刺激时间：0 min(左)，90 min(中)，180 min(右)

2. MitoPeDPP和各种活性氧 (ROS) 及活性氮 (RNS) 反应的选择性

在不含细胞的反应体系中，MitoPeDPP可以与各种过氧化物如H₂O₂，*t*-BHP和ONOO⁻反应，但是在细胞中，积累在线粒体中的MitoPeDPP可以被*t*-BHP氧化而释放出较强荧光(图3A)，却和其它ROS或RNS反应很弱(图3B)。

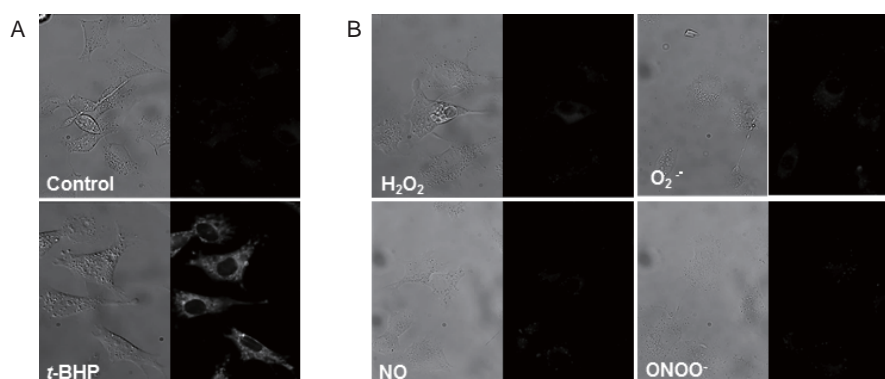


图3. A) 在HepG2细胞中加入MitoPeDPP培养15 min，然后用100 μ mol / l的*t*-BHP处理，培养15 min后的荧光成像图，左边为相差图，右边为荧光图。

B) 在HepG2细胞中加入MitoPeDPP培养后，分别加入100 μ mol / l (H₂O₂，NO和ONOO⁻)和10 μ mol / l (O₂^{•-})，PMA用来生成O₂^{•-}。

* *t*-BHP : tert - Butylhydroperoxide; PMA, Phorbol myristate acetate;

SIN - 1, 3 - (Morpholinyl)sydnonimine, hydrochloride;

NOC 7, 1 - Hydroxy - 2 - oxo - 3 - (N - methyl - 3 - aminopropyl) - 3 - methyl - 1 - triazene

波长/带通滤波器：470/40 (Ex), 525 /50 (Em)

参考文献

- 1) K. Shioji et al., "Synthesis and properties of fluorescence probe for detection of peroxides in mitochondria", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 3911.
- 2) K. Shioji et al., "Fluorescence imaging of accumulated lipid peroxidation in mitochondria by oxidative stress", *Bioorg. Med. Chem.*, submitted.

DOJINDO 东仁化学科技(上海)有限公司

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

网址：<http://www.dojindo.cn>

E-mail: info@dojindo.cn

上海

北京

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室

邮编：200030

邮编：100029

电话：400-823-9388

电话：010-8225-1765

2017年08月