

### 概述

研究证实铁是生物体内量最多的过渡金属元素。其参与多种生理活动。近几年，细胞内的游离铁离子由于具有很高的反应性，和细胞损伤、死亡有一定的关联而得到了越来越多的关注。在细胞内游离铁离子以稳定的Fe<sup>2+</sup>和 Fe<sup>3+</sup>形式存在。从细胞内的还原环境，金属转运体及Fe<sup>2+</sup>的水溶性考虑，认为揭示细胞内Fe<sup>2+</sup>的行为比Fe<sup>3+</sup>更重要。

Mito-FerroGreen是一种新型荧光探针，用于检测线粒体(铁硫簇和血红素蛋白的合成场所)内亚铁离子Fe<sup>2+</sup>，同时也可用于细胞内Fe<sup>2+</sup>的荧光成像。

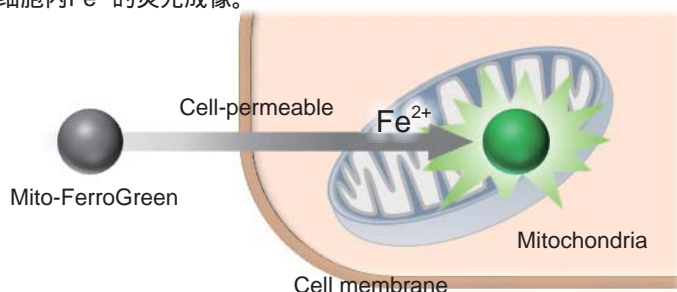


图1. Mito-FerroGreen检测线粒体内亚铁离子Fe<sup>2+</sup>

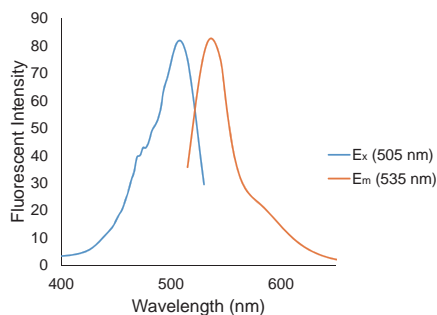


图2. Mito-FerroGreen的荧光图谱

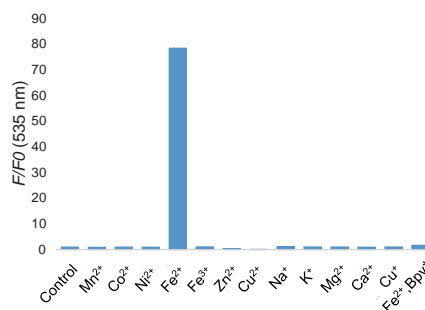


图3. Mito-FerroGreen与各种金属离子的选择性  
\* Bpy; 2,2'-Bipyridyl

### 试剂内含

Mito-FerroGreen ..... 50 μg × 2

### 储存条件

-20 °C，避光

### 所需的设备和材料

- Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
- HBSS
- 无血清培养基
- 移液器

### 溶液制备

#### 制备Mito-FerroGreen工作液

加53 μl的DMSO溶液至含有50 μg Mito-FerroGreen的管子中，用移液器吹打混匀，制成浓度为1 mmol/l的Mito-FerroGreen储存液。用HBSS缓冲液稀释Mito-FerroGreen储存液，制成浓度为5 μmol/l的Mito-FerroGreen工作液。

1 mmol/l的Mito-FerroGreen 储存液和5 μmol/l的Mito-FerroGreen工作液都不能长期保存，建议在实验前现配现用。由于Mito-FerroGreen的降解会增加背景荧光，如果不能一次用完，剩余的Mito-FerroGreen 储存液和工作液不建议继续使用。也可以用乙醇来代替DMSO，用乙醇配制的工作液在-20 °C可稳定保存2周。稀释用的HBSS也可以用无血清培养基代替，但不要使用含血清的培养基，会造成背景过高。

### 操作步骤

1. 在培养皿中接种细胞后，在37 °C，5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。
2. 去除培养基后，用HBSS缓冲液或无血清培养基清洗细胞3次。
3. 加入5 μmol/l的Mito-FerroGreen工作液，在37 °C，5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养30 min。
4. 去除上清液后，用HBSS缓冲液或无血清培养基清洗细胞3次。
5. 加入含有激活剂(如Erastin、RSL3)的培养基，在37 °C，5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。  
具体培养时间，要根据实验条件自行优化。
6. 在荧光显微镜下观察细胞。  
步骤3的加入5 μmol/l的Mito-FerroGreen工作液和步骤5的加入激活剂的顺序可以根据实验条件改变。

1. 用Mito-FerroGreen检测线粒体中的亚铁离子 (Fe<sup>2+</sup>)

1. 在  $\mu$ -Slide 8 well (Ibidi) 中接种HeLa细胞，在37℃，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养。
2. 去除培养基后，用HBSS缓冲液或无血清培养基清洗细胞3次。
3. 加入Mito-FerroGreen工作液 (5  $\mu$ mol/l, 200  $\mu$ l)，在37℃，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养30 min。
4. 去除上清液后，加入含有10 mmol/l的去铁胺甲磺酸盐[Deferoxamine Mesylate Salt (Sigma)]的HBSS缓冲液，在37℃，5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养30 min。
5. 去除上清液并用HBSS缓冲液清洗3次后，加入无血清培养基。
6. 用超纯水配制10 mmol/l的硫酸亚铁铵 (Ammonium Iron(II) Sulfate) 溶液，加入细胞中，调至终浓度为100  $\mu$ mol/l。
7. 在37℃，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养1 h后，去除上清液，用HBSS缓冲液清洗3次。
8. 在共聚焦显微镜下观察细胞。

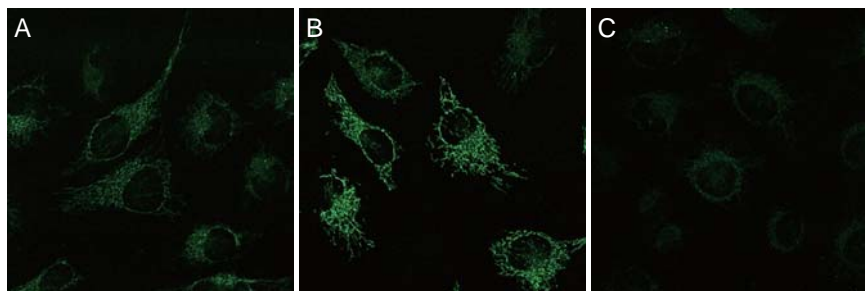


图4. 用Mito-FerroGreen检测HeLa细胞线粒体内的Fe<sup>2+</sup>  
 Ex/Em = 488 nm/ 500-550 nm  
 A : 对照组    B : 用Ammonium Iron(II) Sulfate处理  
 C : 用Ammonium Iron(II) Sulfate+Deferoxamine处理

2. 线粒体的荧光双染

1. 在  $\mu$ -Slide 8 well (Ibidi)中接种HeLa细胞，在37℃，5% CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养。
2. 去除培养基后，用HBSS缓冲液或无血清培养基清洗细胞3次。
3. 取200  $\mu$ l含有终浓度为5  $\mu$ mol/l的Mito-FerroGreen和200 nmol/l MitoBright Deep Red (Dojindo, 货号 : MT08)的HBSS溶液加入细胞中。在37℃，5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养30 min。
4. 去除上清液后，用HBSS缓冲液清洗细胞3次。
5. 加入200  $\mu$ l无血清培养基和用超纯水配制的10 mmol/l硫酸亚铁铵 (Ammonium Iron(II) Sulfate) 溶液至细胞中，调至终浓度为100  $\mu$ mol/l。
6. 在37℃，5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养1 h后，去除上清液，用HBSS缓冲液清洗3次。
7. 在共聚焦显微镜下观察细胞。

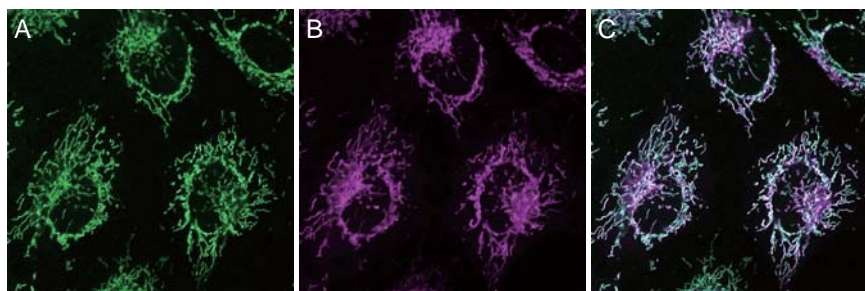


图5. 线粒体的荧光双染  
 Mito-FerroGreen (5  $\mu$ mol/l) Ex/Em = 488 nm/ 500-550 nm  
 MitoBright Deep Red (200 nmol/l) Ex/Em = 640 nm/ 656-700 nm  
 A. Mito-FerroGreen    B. MitoBright Deep Red    C. Merge

本产品是在Dr. Hideko Nagasawa 和Dr. Tasuku Hirayama (Gifu Pharmaceutical University) 指导下开发的。



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](mailto: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

2018年9月