线粒体超氧化物检测试剂盒（MitoNeoD）

货号: KTA9012　　规格：200 T/1000 T　　批号：见产品标签

	应用实验：适用细胞样本的流式细胞术、荧光检测等实验
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月

01 背景与原理

超氧阴离子（$O_2^{\bullet-}$）是氧分子经单电子还原生成的自由基阴离子，属活性氧（ROS）初级形式。线粒体 $O_2^{\bullet-}$ 主要源于电子传递链电子泄漏，关键位点包括复合物 I 和 III；复合物 I 抑制、反向电子传递或泛醌/泛半醌积累可使其生成增加。$O_2^{\bullet-}$ 直接反应性有限，其危害主要经二次反应介导：超氧化物歧化酶（SOD）催化其歧化为 H_2O_2，后者在 Fe^{2+} 等参与下经 Fenton 反应生成羟基自由基（·OH）；·OH 反应性极强，可引发脂质过氧化、蛋白质氧化/羰基化及线粒体 DNA 氧化损伤（如 8-oxodG 形成）。线粒体 $O_2^{\bullet-}$ 生成与清除失衡可致氧化应激。现有研究提示，该氧化应激与神经退行性疾病（如肌萎缩侧索硬化、帕金森病、阿尔茨海默病）、心血管病变及代谢紊乱等病理过程密切相关。

MitoNeoD（别名 MND、Mito-NeoD、Mito Neo D、Mito Neo-D）是一种可快速、特异靶向线粒体并选择性检测线粒体 $O_2^{\bullet-}$ 的荧光探针。其结构含三个功能单元：还原型菲啶核心为 $O_2^{\bullet-}$ 响应基团，未氧化时荧光极弱，氧化后生成红色荧光产物，新戊基取代可空间阻止产物嵌入 DNA；6 位碳-氘键经动力学同位素效应（KIE）降低非特异性氧化速率，提高对 $O_2^{\bullet-}$ 的选择性；三苯基鏻亲脂性阳离子在膜电位驱动下穿越细胞膜并富集于线粒体基质，实现线粒体靶向。

与基于 MitoSOX Red 的线粒体超氧化物检测试剂盒相比，MitoNeoD 的荧光产物无需结合 DNA 即可发出荧光，信号定位于线粒体，且对线粒体功能干扰较低；因此，其在定位准确性、信号特异性及对线粒体生理状态的低扰动性方面优于 MitoSOX Red。本试剂盒适用于荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光酶标仪及流式细胞仪等荧光检测系统，荧光信号检测通道为红色通道（Ex/Em=545 nm/610 nm）。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	200 T	1000 T	
MitoNeoD（5 mM）	20 μL	100 μL	-20℃，避光保存
Assay Buffer	40 mL	100 mL×2	4℃
mSox UP	40 μL	200 μL	-20℃，避光保存

注：本试剂盒 200 T/1000 T 规格用于荧光显微镜、荧光酶标仪及激光共聚焦显微镜时，以 96 孔板为例，每孔 100 μL 体系，可以分别进行 200 次和 1000 次检测；以 24 孔板为例，每孔 200 μL 体系，可以分别进行 100 次和 500 次检测，以此类推。用于流式细胞仪时，每个样本 200 μL 体系，可以分别进行 100 次和 500 次检测。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪、激光共聚焦显微镜、离心机、细胞培养箱	荧光信号检测通道: Ex/Em=545/610 nm; MitoNeoD 流式细胞仪检测通道为 PE 通道
耗材	/	/
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）	/
其他	可调节式移液枪及枪头	/

04 注意事项

(1) 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

(2) 为避免交叉污染，在加入不同样本和不同试剂时都需更换吸头。

(3) 实验开始前确保所有的组分及设备处于合适的温度。

(4) 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。

(5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
mSox UP Working Reagent	使用细胞培养基以 1:1000 的比例稀释 mSox UP。	mSox UP 工作液现配现用，操作全程避免光照；经稀释的工作液不可久置。
MitoNeoD Working Reagent	临用前配制，Assay Buffer 使用前，平衡到室温。使用 Assay Buffer 以 1:1000 的比例稀释 MitoNeoD。	MitoNeoD 染色工作液现配现用，操作全程避免光照；经稀释的工作液不可久置。

05-2 实验步骤

05-2-1 荧光显微镜分析

1. 对于贴壁细胞

(1) 以 96 孔板培养的贴壁细胞为例，孔板内接种适量细胞，使其生长至所需密度后处理细胞;

(2) 可选步骤：阳性对照制备，使用 PBS 浸洗孔中细胞 2 次，向孔中加入 100 μL mSox UP Working Regent，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃诱导 2-4 h，期间观察细胞形态，细胞形态发生变化后，吸弃 mSox UP Working Regent，并使用 PBS 浸洗孔中细胞 2 次;

注意：多数细胞经 mSox UP 诱导 2-4 h 后，超氧化物水平显著升高，经 MitoNeoD 染色后，可见明显红色荧光信号，而未经诱导的正常细胞仅见微弱红色荧光信号。而不同细胞对 mSox UP 的适宜浓度与孵育时长存在差异，建议自行优化最佳条件，且少数细

胞甚至可能对该诱导剂不敏感。

(3) 吸弃 PBS，随后加入 100 μL MitoNeoD Working Regent，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃孵育 20-30 min；

注意：MitoNeoD 工作浓度因细胞种类及实验条件而异，应通过预试验确定。建议起始浓度为 5 μM，可在 2.5-10 μM 间筛选适宜浓度。若阳性对照信号偏弱，可上调浓度；若背景信号偏高，可下调浓度。针对特定细胞开展检测时，宜先行预试验。

(4) 孵育结束后，吸弃 MitoNeoD Working Regent，使用 PBS 浸洗细胞 2 次；

(5) 如果需要对线粒体进行染色，可使用 MitoGreen（TraKine™线粒体染色试剂盒（绿色荧光），KTC4003）染色 10 min。如无其它的特殊需要，弃去 PBS，加入 100 μL Assay Buffer，于荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

2. 对于非贴壁细胞

(1) 培养细胞至最佳密度，台盼蓝计数后细胞活率在 95%以上。

(2) 可选步骤：阳性对照制备，300 g 离心 5 min 收集细胞（细胞密度约 1×10^6），使用 PBS 洗两次，加入 1 mL mSox UP Working Regent。在 CO_2 细胞培养箱中 37℃诱导 2-4 h，期间观察细胞形态，细胞形态发生变化后，300 g 离心 5 min 收集细胞，弃去 mSox UP Working Regent，并使用 PBS 浸洗孔中细胞 2 次；

注意：多数细胞经 mSox UP 孵育 2-4 h 后，超氧化物水平显著升高，经 MitoNeoD 染色后，可见明显红色荧光信号，而未经诱导的正常细胞仅见微弱红色荧光信号。而不同细胞对 mSox UP 的适宜浓度与孵育时长存在差异，建议自行优化最佳条件，且少数细胞甚至可能对该诱导剂不敏感。

(3) 300 g 离心 5 min 收集细胞，吸弃 PBS，加入 200 μL MitoNeoD Working Regent，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃孵育 20-30 min；

注意：MitoNeoD 工作浓度因细胞种类及实验条件而异，应通过预试验确定。建议起始浓度为 5 μM，可在 2.5-10 μM 间筛选适宜浓度。若阳性对照信号偏弱，可上调浓度；若背景信号偏高，可下调浓度。针对特定细胞开展检测时，宜先行预试验。

(4) 300 g 离心 5 min 收集细胞，使用 PBS 洗 2 次；

(5) 300 g 离心 5 min 收集细胞，使用适量的 Assay Buffer 重悬细胞，制备细胞悬液。将制备好的细胞悬液样本置于玻片上，用盖玻片盖住细胞，于荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。或是将细胞悬液滴加在 96 孔板中，静置 5 min 后于荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

注意：对于体积较小的细胞（如 Jurkat），经 MitoNeoD 染色后荧光信号较弱，普通荧光显微镜难以清晰观察；建议使用检测灵敏度更高的激光共聚焦显微镜进行观察。

05-2-2 流式细胞仪检测

1. 对于贴壁细胞

(1) 以 96 孔板培养的贴壁细胞为例，选用黑色 96 孔酶标板，孔板内接种适量细胞，使其生长至所需密度后处理细胞；

(2) 可选步骤：阳性对照制备，使用 PBS 浸洗孔中细胞 2 次，向孔中加入 100 μL mSox UP Working Regent，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃诱导 2-4 h，期间观察细胞形态，细胞形态发生变化后，吸弃 mSox UP Working Regent，并使用 PBS 浸洗孔中细胞 2 次；

注意：多数细胞经 mSox UP 诱导 2-4 h 后，超氧化物水平显著升高，经 MitoNeoD 染色后，可见明显红色荧光信号，而未经诱导的正常细胞仅见微弱红色荧光信号。而不同细胞对 mSox UP 的适宜浓度与孵育时长存在差异，建议自行优化最佳条件，且少数细胞甚至可能对该诱导剂不敏感。

(3) 吸弃 PBS，随后加入 100 μL MitoNeoD Working Regent，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃孵育 20-30 min；

注意：MitoNeoD 工作浓度因细胞种类及实验条件而异，应通过预试验确定。建议起始浓度为 5 μM，可在 2.5-10 μM 间筛选适宜浓度。若阳性对照信号偏弱，可上调浓度；若背景信号偏高，可下调浓度。针对特定细胞开展检测时，宜先行预试验。

(4) 孵育结束后，吸弃 MitoNeoD Working Regent，使用 PBS 浸洗细胞 2 次；

(5) 将制备好的细胞样本使用温和消化液消化，然后 300 g 离心 5 min 收集细胞，并使用 PBS 清洗 2 次。

(6) 弃去 PBS，加入适量 Assay Buffer 重悬细胞后于流式细胞仪分析。

2. 对于悬浮细胞

(1) 培养细胞至最佳密度，台盼蓝计数后细胞活率在 95%以上。

(2) 可选步骤：阳性对照制备，300 g 离心 5 min 收集细胞（细胞密度约 1×10^6），使用 PBS 洗两次，加入 1 mL mSox UP Working Regent。在 CO_2 细胞培养箱中 37℃诱导 2-4 h，期间观察细胞形态，细胞形态发生变化后，300 g 离心 5 min 收集细胞，弃去 mSox UP Working Regent，并使用 PBS 浸洗孔中细胞 2 次；

注意：多数细胞经 mSox UP 孵育 2-4 h 后，超氧化物水平显著升高，经 MitoNeoD 染色后，可见明显红色荧光信号，而未经诱导的正常细胞仅见微弱红色荧光信号。而不同细胞对 mSox UP 的适宜浓度与孵育时长存在差异，建议自行优化最佳条件，且少数细胞甚至可能对该诱导剂不敏感。

(3) 300 g 离心 5 min 收集细胞，吸弃 PBS，加入 200 μL MitoNeoD Working Regent，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃孵育 20-30 min；

注意：MitoNeoD 工作浓度因细胞种类及实验条件而异，应通过预试验确定。建议起始浓度为 5 μM，可在 2.5-10 μM 间筛选适宜浓度。若阳性对照信号偏弱，可上调浓度；若背景信号偏高，可下调浓度。针对特定细胞开展检测时，宜先行预试验。

(4) 300 g 离心 5 min 收集细胞，使用 PBS 洗 2 次，加入适量 Assay Buffer 重悬细胞后于流式细胞仪分析。

05-2-3 荧光酶标仪检测

1. 对于贴壁细胞

(1) 以 96 孔板培养的贴壁细胞为例，选用 96 孔黑色透底酶标板，孔板内接种适量细胞，使其生长至所需密度后处理细胞；

(2) 可选步骤：阳性对照制备，使用 PBS 浸洗孔中细胞 2 次，向孔中加入 100 μL mSox UP Working Regent，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃诱导 2-4 h，期间观察细胞形态，细胞形态发生变化后，吸弃 mSox UP Working Regent，并使用 PBS 浸洗孔中细胞 2 次；

注意：多数细胞经 mSox UP 诱导 2-4 h 后，超氧化物水平显著升高，经 MitoNeoD 染色后，可见明显红色荧光信号，而未经诱导的正常细胞仅见微弱红色荧光信号。而不同细胞对 mSox UP 的适宜浓度与孵育时长存在差异，建议自行优化最佳条件，且少数细胞甚至可能对该诱导剂不敏感。

(3) 吸弃 PBS，随后加入 100 μL MitoNeoD Working Regent，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃孵育 20-30 min；

注意：MitoNeoD 工作浓度因细胞种类及实验条件而异，应通过预试验确定。建议起始浓度为 5 μM，可在 2.5-10 μM 间筛选适宜浓度。若阳性对照信号偏弱，可上调浓度；若背景信号偏高，可下调浓度。针对特定细胞开展检测时，宜先行预试验。

(4) 孵育结束后，弃去 MitoNeoD Working Regent，使用 PBS 浸洗细胞 2 次；

(5) 弃去 PBS，加入 100 μL Assay Buffer，于荧光酶标仪检测，激发波长 545 nm，发射波长 610 nm。

2. 对于悬浮细胞

(1) 培养细胞至最佳密度，台盼蓝计数后细胞活率在 95%以上。

(2) 可选步骤：阳性对照制备，300 g 离心 5 min 收集细胞（细胞密度约 1×10^6），使用 PBS 洗两次，加入 1 mL mSox UP Working Regent。在 CO_2 细胞培养箱中 37℃诱导 2-4 h，期间观察细胞形态，细胞形态发生变化后，300 g 离心 5 min 收集细胞，弃去 mSox UP Working Regent，并使用 PBS 浸洗孔中细胞 2 次；

注意：多数细胞经 mSox Up 孵育 3-4 h 后，超氧化物水平显著升高，经 MitoNeoD 染色后，可见明显红色荧光信号，而未经诱导的正常细胞仅见微弱红色荧光信号。而不同细胞对 mSox UP 的适宜浓度与孵育时长存在差异，建议自行优化最佳条件，且少数细胞甚至可能对该诱导剂不敏感。

(3) 300 g 离心 5 min 收集细胞，吸弃 PBS，加入 200 μL MitoNeoD Working Regent，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃孵育 20-30 min；

注意：MitoNeoD 工作浓度因细胞种类及实验条件而异，应通过预试验确定。建议起始浓度为 5 μM，可在 2.5-10 μM 间筛选适宜浓度。若阳性对照信号偏弱，可上调浓度；若背景信号偏高，可下调浓度。针对特定细胞开展检测时，宜先行预试验。

(4) 300 g 离心 5 min 收集细胞，使用 PBS 洗 2 次，加入适量 Assay Buffer 重悬细胞，取 100 μL 细胞悬液加入 96 孔黑色透底酶标板，于荧光酶标仪检测，激发波长 545 nm，发射波长 610 nm。

06 结果示例

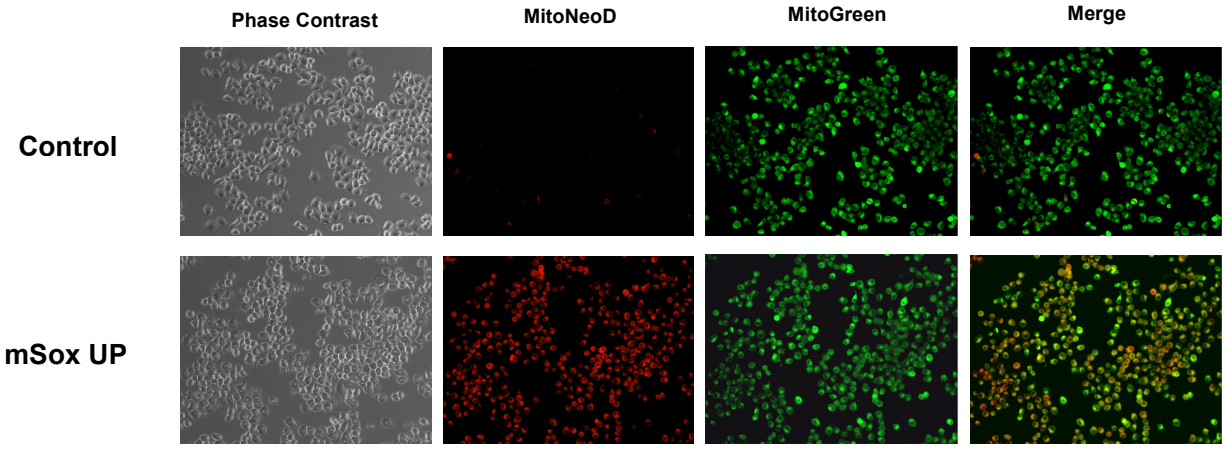


Figure 1. Hela 细胞使用线粒体超氧化物检测试剂盒染色的荧光显微镜结果图。Hela 细胞不处理或用阳性对照试剂 mSox UP 处理后，使用本试剂盒和 MitoGreen 进行染色。绿色荧光为 MitoGreen 标记的所有细胞的线粒体，本试剂盒中不提供 MitoGreen，如有需要可向亚科因订购 TraKine™线粒体染色试剂盒（绿色荧光）（KTC4003）。

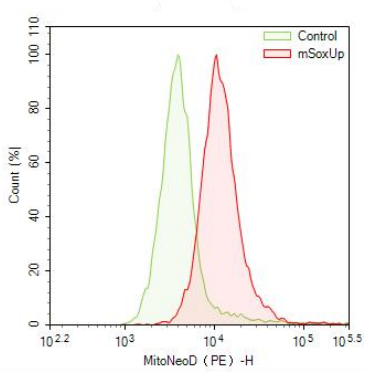


Figure 2. Jurkat 细胞使用线粒体超氧化物检测试剂盒染色的流式细胞仪结果图。

07 FAQ

1. 试剂盒染色后，PC 组与 NC 组信号无显著差异怎么处理?

针对部分较敏感的细胞，如 HEK293，由于操作过程会对细胞易造成损伤，导致 NC 组出现较高的阳性信号，因此建议操作改为先装载探针后诱导。使用 MitoNeoD 染色 30 min 后，使用 PBS 清洗 2 次，PC 组加入 mSox UP Working Regent 诱导 2-4 h，NC 组则加入细胞培养基，一并放入 CO_2 细胞培养箱中。

2. 稀释 mSox UP 时，使用基础培养基还是完全培养基?

都可以，若使用完全培养基配制的 mSox UP Working Regent，诱导后效果不佳，可以考虑更换成基础培养基配制诱导剂，且诱导期间，NC 组也更换为基础培养基。

08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA4001	**线粒体膜电位分析试剂盒（JC-1法）**
KTA4002	**线粒体通透性转换孔(MPTP)检测试剂盒**
KTA9010	**氧消耗率(OCR)检测试剂盒**
KTB1910	**CheKine™ 活性氧（ROS）含量检测试剂盒（绿色荧光）**

线粒体超氧化物检测试剂盒（MitoNeoD）

（Abbkine 货号 ： KTA9012）

一 样本处理

① 贴壁细胞

细胞培养

阳性对照制备：PBS浸洗细胞2次
加入100 μL mSox UP Working Regent，37℃诱导2-4 h

PBS洗2次，加入100 μL MitoNeoD Working Regent
37℃孵育20-30 min

② 非贴壁细胞

细胞培养

阳性对照制备：300g离心收集细胞（1×10^6），PBS洗2次
加入1 mL mSox UP Working Regent，37℃诱导2-4 h

PBS洗2次，加入200 μL MitoNeoD Working Regent
37℃孵育20-30 min

二 样本检测

弃去工作液，PBS洗2次
加入适量Assay Buffer

荧光显微镜、
激光共聚焦显微镜分析

荧光酶标仪分析

流式细胞仪分析

试剂名称	试剂准备
MitoNeoD Working Regent	用Assay Buffer以1:1000比例稀释
mSox UP Working Regent	使用细胞培养基以1:1000比例稀释

V1.0