

A549-mitoDsRed Cell Line

产品说明书

1. 背景

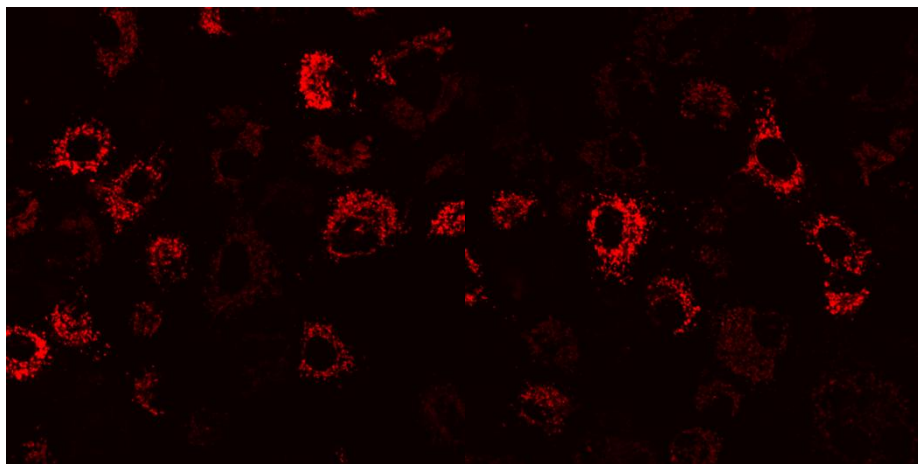
MitoDsRed 介绍

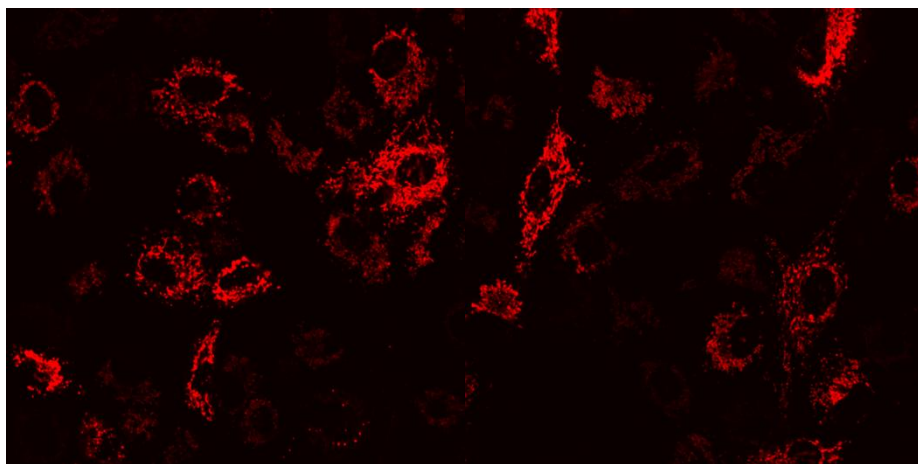
MitoDsRed 是一类基因编码的荧光探针，通过将红色荧光蛋白 DsRed 与线粒体靶向序列（MTS）融合，实现对活细胞内线粒体的特异性标记与可视化。该工具自问世以来，已成为细胞生物学研究中观察线粒体形态、动态变化及细胞器互作的核心手段之一。DsRed 蛋白的荧光产生依赖于其生色团的自主催化形成过程。这一过程包括环化、氧化和脱水等步骤，在 DsRed2 中经过优化后，成熟时间显著缩短但仍需数小时。因此，在瞬时转染实验中，通常需要在转染后 24-48 小时进行成像，以允许足够的蛋白表达和成熟。慢病毒介导的 MitoDsRed 可以实时表达荧光。

Mito-DsRed2 融合蛋白的激发峰位于 558 nm，发射峰位于 583 nm，流式细胞术中可用 488 nm 激光激发，通过 FL-2 通道（585 nm）检测。与 GFP/EYFP（激发 488 nm，发射 510-530 nm）实现双色成像，无光谱重叠。

A549 细胞是由 D·J·Griad 通过肺癌组织移植 培养建系，源自于一位 58 岁白人男性；属于人类 非小细胞肺癌细胞系，是肺癌人类肺泡基底上皮 细胞，一般用于肺癌、病毒等方向的研究。具体参考货号 GC080200006。

基恩科生物通过慢病毒 pLV-mitoDsRed-puro（货号：GC010401859）感染 A549 细胞，Puro（筛选浓度：2 μ g/mL）筛选后构建了稳定表达 MitoDsRed，成功构建稳定表达 MitoDsRed-A549 细胞，A549-mitoDsred 细胞中，红色荧光呈点状、短棒状或管状分布，与线粒体的典型形态一致。在神经元中，标记的线粒体可沿轴突和树突长距离运输，其形态随着运输和局部微环境的变化而动态改变。





A549-mitoDsred Cell Line 荧光照片

附录: A549-mitoDsred Cell Line

细胞培养方法

1. 培养条件

- 1) 完全培养基成分: **专用培养基 (货号: SZJNK-01483-001)** 或 90%Ham's F-12+10% FBS+1% P/S
- 2) 培养环境: 37℃、5%CO₂
- 3) 传代比例: 1:2~1:4
- 4) 传代频次: 2~3 天传代一次
- 5) 冻存条件: 冻存液: 90%FBS+10%DMSO 温度: 液氮

2. 细胞培养

2.1 细胞复苏

- 2.1.1 从液氮罐或者-80℃冰箱取出细胞冻存管, 并迅速将冻存管置于 37℃水浴中来回晃动, 迅速解冻。为避免污染, 可将冻存管置于干净的一次性 PE 手套内再置于水浴中。
- 2.1.2 待冻存管中液体融化后, 立即取出, 并用 75%酒精纱布擦拭冻存管表面。
- 2.1.3 将冻存管置于生物安全柜中, 并将冻存管中的液体转移到含有约 9mL 完全培养基的离心管中, 300g, 5min 离心, 弃上清。
- 2.1.4 用适量的完全培养基重悬细胞并转移到新的培养瓶中, 并将细胞置于 5% CO₂、37℃恒温培养箱静置培养。

2.2 细胞传代

- 2.2.1 当细胞密度达到 80%以上时, 可以进行传代, **传代比例 1:2~1:4, 2~3 天传代一次**。具体操作如下:
- 2.2.2 吸取并弃掉培养瓶中培养基, 加入适量 PBS, 轻轻晃动润洗细胞, 然后将 PBS 吸出。
- 2.2.3 加入约 1.0 mL **0.25%胰酶**, 轻轻晃动浸润细胞, 然后放在培养箱内消化 2~3 分钟, 在显微镜下观察发现细胞变圆, 轻轻拍打瓶壁观察到 80%细胞从壁上脱落分离时即可加入约 5ml 完全培养基中和胰蛋白酶。并轻轻吹打将细胞从培养瓶表面吹落使细胞分散成单细胞悬液。(此处为 T75 培养瓶所用体积, 可根据实际情况增减用量)。
- 2.2.4 将终止消化后的细胞悬液转移至干净的 15ml 离心管中, 300g, 5min 离心, 弃上清。
- 2.2.5 用适量的完全培养基重悬细胞, 并按照传代比例(推荐**传代比例 1: 2~1: 4**)转移到新的培养瓶中, 并将细胞置于 5% CO₂、37℃恒温培养箱静置培养。

2.3 细胞冻存

细胞汇合度达到 80%-90%时可进行细胞冻存操作。自制冻存液成分: 90%FBS+10%DMSO, 为保证冻存细胞较高活力, 冻存液最好提前配制并置于 4℃冰箱预冷。

细胞冻存具体操作如下:

- 2.3.1 吸取并弃掉培养瓶中培养基, 加入适量 PBS 洗涤一次。
- 2.3.2 加入约 1.0 mL 0.25%胰酶, 轻轻晃动浸润细胞, 然后放在培养箱内消化 2~3 分钟, 在显微镜下观察发现细胞变圆, 轻轻拍打瓶壁观察到 80%细胞从壁上脱落分离时即可加入约 5ml 完全培养基中和胰蛋白酶。并轻轻吹打将细胞

从培养瓶表面吹落使细胞分散成单细胞悬液。（此处为 T75 培养瓶所用体积，可根据实际情况增减用量）。

2.3.3 将终止消化后的细胞悬液转移至干净的 15ml 离心管中，300g，5min 离心，弃上清。

2.3.4 根据细胞沉淀量加入适量提前配制好并预冷的细胞冻存液（推荐 1 个 T75 培养瓶的细胞可加入 3ml 冻存液），轻轻吹打使细胞分散。

2.3.5 将细胞悬液转移至细胞冻存管中，1ml/管。冻存管需提前写好标签或者贴好标签。标签信息包含细胞名称，代数，冻存时间及操作人员姓名等。

2.3.6 将细胞冻存管置于细胞程序降温盒中，并将盒子置于-80℃冰箱中过夜。过夜后可将冻存管转移至液氮罐中长期保存。

参考文献:

- Kitay BM, McCormack R, Wang Y, Tsoulfas P, Zhai RG. Mislocalization of neuronal mitochondria reveals regulation of Wallerian degeneration and NMNAT/WLD(S)-mediated axon protection independent of axonal mitochondria. *Hum Mol Genet.* 2013 Apr 15;22(8):1601-14. doi: 10.1093/hmg/ddt009
- Jiao H, Jiang D, Hu X, Du W, Ji L, Yang Y, Li X, Sho T, Wang X, Li Y, Wu YT, Wei YH, Hu X, Yu L. Mitocytosis, a migrasome mediated mitochondrial quality-control process. *Cell.* 2021 May 27;184(11):2896-2910.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.027.
- Ansari MY, Novak K, Haqqi TM. ERK1/2-mediated activation of DRP1 regulates mitochondrial dynamics and apoptosis in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2022 Feb;30(2):315-328. doi: 10.1016/j.joca.2021.11.003
- Zhuang H, Tian W, Li W, Zhang X, Wang J, Yang Y, Liu X, Xia Z, Feng D, Zhang L. Autophagic Cell Death and Apoptosis Jointly Mediate Cisatracurium Besylate-Induced Cell Injury. *Int J Mol Sci.* 2016 Apr 6;17(4):515. doi: 10.3390/ijms17040515
- Sreerangaraja Urs DB, Wu WH, Komrskova K, Postlerova P, Lin YF, Tzeng CR, Kao SH. Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility. *Int J Mol Sci.* 2020 May 19;21(10):3592. doi: 10.3390/ijms21103592.
- Indira D, Varadarajan SN, Subhasingh Lupitha S, Lekshmi A, Mathew KA, Chandrasekharan A, Rajappan Pillai P, Pulikkal Kadamberi I, Ramachandran I, Sekar H, Kochucherukkan Gopalakrishnan A, Tr S. Strategies for imaging mitophagy in high-resolution and high-throughput. *Eur J Cell Biol.* 2018 Jan;97(1):1-14. doi: 10.1016/j.ejcb.2017.10.003.
- Kedra J, Lin S, Pacheco A, Gallo G, Smith GM. Axotomy Induces Drp1-Dependent Fragmentation of Axonal Mitochondria. *Front Mol Neurosci.* 2021 Jun 3;14:668670. doi: 10.3389/fnmol.2021.668670