

脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)

产品货号: 26736

产品规格: 100-1000次/500-5000次

产品简介:

脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red), 英文名为Lipid Droplets Red Fluorescence Assay Kit with Nile Red, 也称 Nile Red Staining Kit或Red Neutral Lipid Stain, 是一种基于荧光探针尼罗红(Nile Red)来检测细胞内脂滴(Lipid droplets) 的试剂盒。本试剂盒适用于荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测系统。

脂滴是由磷脂单分子层及甘油三酯(Triglyceride)、胆固醇酯(Cholesteryl ester, CE)组成的中性脂肪(Neutral lipid)疏水核心构成, 广泛存在于动物、细菌、酵母、植物和昆虫细胞中。脂滴能够沿着细胞骨架运动, 并与其它细胞器相互作用, 在脂类代谢与存储、膜转运、蛋白降解、以及信号传导过程中起着重要的作用。多种代谢性疾病, 如肥胖、脂肪肝、心血管疾病及糖尿病、中性脂贮存性疾病和Niemann Pick C疾病等, 可能都伴随着脂质贮存的异常。

本试剂盒所使用的荧光探针为尼罗红(Nile Red), 又称Nile blue oxazone, CAS号为7385-67-3, 分子量为318.37, 其在磷脂 (phospholipid)中最大激发光波长约为552nm, 最大发射光波长约为636nm, 此时为红色荧光; 也可以把激发波长设置为450-500nm, 发射波长设置为大于528nm, 此时为绿色荧光; 但红色荧光通常比绿色荧光明亮很多。由于Nile Red在红色荧光时 也可以染细胞膜, 而在绿色荧光时只染脂滴, 所以如果特别关注脂滴的特异性时, 也可以设置参数为Ex/Em=485/535nm进行检测。Nile Red在磷脂中的激发光和发射光光谱参考图1。

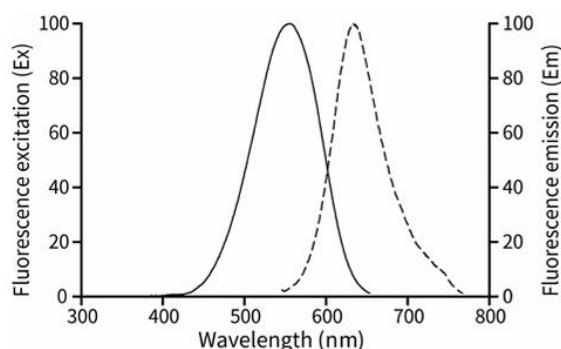


图1. Nile Red在磷脂中的激发光和发射光光谱。

Nile Red在水和其它极性溶剂中几乎无任何荧光, 一旦与甘油三酯等中性脂肪结合, 便发出明亮的红色荧光 (由于其发射光谱范围广, 也可以设置参数观察到绿色荧光)。使用本试剂盒检测细胞内脂滴的效果参考图2。

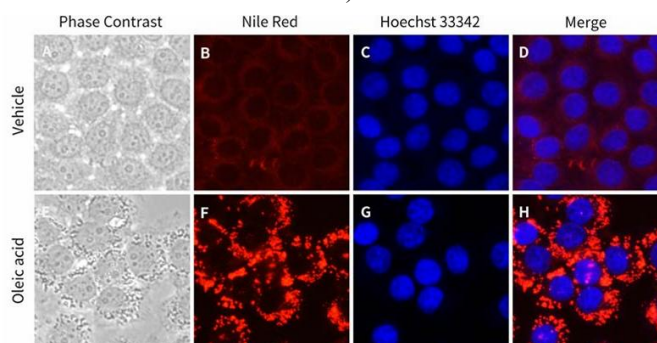


图2. 脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)检测HeLa细胞内脂滴的效果图。图A为正常HeLa细胞在显微镜明场下的形态, 正常细胞内无明显的脂滴聚集现象, 因此经Nile Red染色后呈较弱的红色荧光(图B), 主要是细胞膜上脂类的染色; 图E为使用油酸 (Oleic acid)诱导后细胞在显微镜明场下形态, 此时细胞内有很明显的脂滴聚集, 细



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

胞内脂滴被Nile Red染成明亮的红色荧光(图F)。图C、G为细胞核染色效果，图D、H为脂滴和细胞核的叠加图。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异，本图仅供参考。

对于96孔板中的样品，按照每孔使用100 μ l染色液计算，本试剂盒的小包装和中包装可以进行1000次和5000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，本试剂盒的小包装可以进行200次和1000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染色液计算，本试剂盒的小包装可以进行100次和500次检测。

产品内容：

产品名称	100-1000次	500-5000次	保存条件
Nile Red (1000 $\times$)	0.1ml	0.5ml	-20 $^{\circ}$ C，避光
Hoechst 33342 (1000 $\times$)	0.1ml	0.5ml	-20 $^{\circ}$ C，避光
Assay Buffer	100ml	500ml	-20 $^{\circ}$ C，避光

注意事项：

1. 由于Nile Red的发射光谱范围广，即有绿色荧光也有红色荧光，所以尽量避免其它荧光的染色和检测。如果一定要进行双重染色，由于Nile Red在激光照射下很快淬灭，所以可以先检测Nile Red，并在淬灭后再进行其它荧光的检测。
2. 第一次使用时建议适当分装，避免反复冻融。
3. Nile Red的工作浓度、细胞量、孵育温度和时间等可根据所使用的细胞进行适当摸索和优化，例如Nile Red的浓度可在0.2 $\times$ —2 $\times$ 之间适当调整。
4. Nile Red在激光照射下很容易发生淬灭，因此需要在保证荧光亮度的前提下尽可能降低染料使用浓度，降低荧光显微镜激发光强度，缩短拍照时间。
5. 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。
6. 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。
7. 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. 染色液的配制：

按照6孔板每孔1ml脂滴染色液的体系，参考下表配制适量的染色液，并充分混匀。

Reagent	1 Sample	10 Samples	100 Samples
Nile Red (1000 $\times$)	1 μ l	10 μ l	100 μ l
Hoechst 33342 (1000 $\times$)	1 μ l	10 μ l	100 μ l
Assay Buffer	998 μ l	9.98ml	99.8ml
Staining Solution	1ml	10ml	100ml

注：配制好的Staining Solution必须一次使用完毕，不建议冻存或4 $^{\circ}$ C保存后继续使用。染色液中Nile Red的浓度可以根据染色效果在0.2 $\times$ —2 $\times$ 之间适当调整。

2. 荧光显微镜检测：

- a. 接种培养。将细胞接种于6孔板等多孔板、细胞培养皿或者细胞爬片上。如有必要，按实验设计对细胞进行一定处理。
- b. 固定(选做)。
 - (a) 取出待检测的细胞，使用PBS洗涤两遍，吸除PBS。
 - (b) 加入4%多聚甲醛固定液室温固定10-15分钟。

注1：Nile Red和Hoechst 33342都适用于活细胞染色，也适用于固定后细胞的染色。

注2：由于醇类能够溶解脂质，因此请使用醛类固定液进行固定。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

注3: 如果需要进行免疫染色而进行细胞通透, 须避免使用含Triton X-100或Tween-20等去垢剂的通透液, 而使用不会溶解细胞膜的去垢剂如含Saponin或Digitonin的通透液, 但仍然可能会一定程度的影响脂滴的形态。

c. 染色。

(a) 取出待检测的细胞, PBS洗涤1-2遍。

(b) 吸除PBS, 加入适当体积的Staining Solution, 通常96孔板每孔加入100 μ l, 24孔板每孔加入250 μ l, 12孔板每孔加入500 μ l, 6孔板每孔加入1ml。室温下避光孵育10-20分钟。

(c) PBS洗涤两遍。

d. 检测。使用荧光显微镜观察时选择使用552nm左右激发, 观察红色荧光; 也可以使用485nm左右激发, 观察绿色荧光。

注: 使用荧光显微镜拍照时, 为了减少荧光淬灭, 尽可能降低荧光显微镜的激发光强度, 缩短拍照时间。

3. 流式细胞仪检测:

a. 细胞准备。

(a) 贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬, 并用PBS洗涤一次; 悬浮细胞250-1000 $\times$ g室温离心5分钟, 弃上清, 用PBS洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为 10^6 个细胞。

(b) 400 $\times$ g室温离心5分钟, 弃上清。

b. 固定(选做)。

(a) 加入4%多聚甲醛固定液, 轻轻吹打重悬为单细胞悬液, 室温固定10-15分钟。

(b) 固定结束后, 400 $\times$ g室温离心5分钟, 弃上清。

(c) 加入0.5ml PBS后缓慢用移液器吹打洗涤, 然后400 $\times$ g室温离心5分钟, 弃上清。

注1: Nile Red和Hoechst 33342都适用于活细胞染色, 也适用于固定后细胞的染色。

注2: 由于醇类能够溶解脂质, 因此请使用醛类固定液进行固定。

注3: 如果需要进行免疫染色而进行细胞通透, 须避免使用含Triton X-100或Tween-20等去垢剂的通透液, 而使用不会溶解细胞膜的去垢剂如含Saponin或Digitonin的通透液, 但仍然可能会一定程度的影响脂滴的形态。

c. 染色。

(a) 对于上一步骤的细胞沉淀, 除背景对照管外, 其余每管加入0.5ml Staining Solution, 轻柔并充分重悬细胞, 室温避光孵育10-15分钟。

(b) 400 $\times$ g室温离心5分钟, 弃上清。

(c) 每孔加入0.5ml PBS后缓慢用移液器吹打洗涤, 然后400 $\times$ g室温离心5分钟, 弃上清。

(d) 每孔加入0.5ml PBS重悬细胞。

d. 检测。检测时参考其光谱特征选择合适的检测条件, 例如Ex/Em=552/636nm或Ex/Em=485/535nm。

注1: 使用仅含Assay Buffer并且未经染色的细胞样品用于流式细胞仪的阴性对照设置。

注2: 由于流式检测比较灵敏, 使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低, 此时可根据细胞类型和实际染色情况对Nile Red的稀释倍数进行适当调整。

4. 荧光酶标仪检测:

a. 接种培养。将细胞接种于96孔板黑色多孔板中, 如全黑96孔细胞培养板, 每孔的细胞数需要控制在100—10,000个, 通常宜在2000-5000个范围内。按实验设计对细胞进行一定处理。

b. 固定(选做)。

(a) 取出待检测的细胞, 使用PBS洗涤两遍, 吸除PBS。

(b) 加入4%多聚甲醛固定液室温固定10-15分钟。

注1: Nile Red和Hoechst 33342都适用于活细胞染色, 也适用于固定后细胞的染色。

注2: 由于醇类能够溶解脂质, 因此请使用醛类固定液进行固定。

注3: 如果需要进行免疫染色而进行细胞通透, 须避免使用含Triton X-100或Tween-20等去垢剂的通透液, 而使用不会溶解细胞膜的去垢剂如含Saponin或Digitonin的通透液, 但仍然可能会一定程度的影响脂滴的形态。

c. 染色。

(a) 取出待检测的细胞, 使用PBS洗涤1-2遍。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

(b) 吸除PBS，加入适当体积的Staining Solution，通常96孔板每孔加入100 μ l。室温下避光孵育10-20分钟。

(c) PBS洗涤两遍。

d. 检测。参考其光谱特征，选取合适的波长进行读板，例如Ex/Em=552/636nm或Ex/Em=485/535nm。具体根据酶标仪的特点选择，也不一定需要选用最大激发光/发射光波长来检测。

5. **阳性对照的诱导方法：**油酸可以诱导培养细胞内脂滴生成，从而可以作为阳性对照。诱导培养细胞内形成脂滴的具体方法如下。

a. 37 $^{\circ}$ C条件下加热油酸，使其完全成为液体。

b. 取48 μ l的油酸，加入到952 μ l的DMSO中，充分混匀，配制成150mM的油酸贮存液。贮存液可以保存在4 $^{\circ}$ C，使用时37 $^{\circ}$ C条件下加热混匀后即可使用。

c. 细胞诱导前，配制含油酸的完全培养液。使用细胞的完全培养液按500: 1稀释油酸贮存液，使油酸终浓度为300 μ M。

注：油酸具有一定的细胞毒性，因细胞而异，可以根据不同细胞状况调整油酸的使用终浓度。

d. 待检测的细胞加入含油酸的完全培养液，37 $^{\circ}$ C培养过夜。一般情况下，次日可以观察到囊泡状的脂滴。

储存条件：

-20 $^{\circ}$ C避光保存，至少一年有效。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>