荧光法脂滴检测试剂盒(红色,Nile Red)

产品编号：MA1800　　规格：100-1000T / 500-5000T

产品内容

产品组成	MA1800-1 100-1000T	MA1800-2 500-5000T
Nile Red（1000×）	0.1mL	0.5mL
Hoechst 33342（1000×）	0.1mL	0.5mL
Assay Buffer	100mL	500mL
说明书	1 份	1 份

产品简介

脂滴（Lipid droplets，LDs）又称脂质体或油体，由磷脂单分子层及中性脂（主要包括甘油三酯和胆固醇酯）组成的疏水核心构成，其大小差别很大，直径从 40nm 至 100μm 不等。脂滴是细胞内中性脂的主要贮存场所，能够沿着细胞骨架运动，并与其它细胞器相互作用，在能量存储、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。脂滴的异常也与肥胖、脂肪肝、心血管疾病及糖尿病等多种代谢性疾病密切相关。

荧光法脂滴检测试剂盒(红色,Nile Red)，即 Lipid Droplets Fluorescence Assay Kit(Red,Nile Red)，是一种基于红光探针尼罗红（Nile Red；Nile blue oxazone；CAS:7385-67-3）来检测细胞内脂滴的试剂盒。尼罗红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，便会发出明亮的橙红色荧光，Ex/Em=552nm/636nm，适配常规 TRITC 滤光片，方便荧光显微镜、共聚焦显微镜观测；亦可在 Ex/Em=585nm/535nm 条件下呈现金黄色荧光，该通道细胞膜磷脂非特异性信号更低，但整体荧光强度弱于红色通道。Hoechst 33342 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料，它在嵌入双链 DNA 后释放强烈的蓝色荧光，可用于细胞核染色，Ex/Em=346nm/460nm。

本试剂盒包含以下主要组分：Nile Red（1000×）、Hoechst 33342（1000×）和 Assay Buffer。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。通过这些检测系统，可以清晰地观察到细胞内脂滴的分布和数量。

对于 96 孔板中的样品，按照每孔使用 100μL 染色液计算，本试剂盒的小包装 MA1800-1 和中包装 MA1800-2 分别可以进行 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 MA1800-1 和中包装 MA1800-2 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 MA1800-1 和中包装 MA1800-2 可以进行 100 次和 500 次检测。

使用方法

（一）阳性对照的诱导方法

油酸（MB2405）和油酸钠 BSA 高脂细胞添加剂（PWL220）均可以诱导培养细胞内脂滴生成，作为阳性对照。

油酸（MB2405）使用具体方法如下：

1. 37℃条件下加热油酸，使其完全成为液体。

2. 取 48μL 的油酸，加入到 952μL 的 DMSO 中，充分混匀，配制成 150mM 的油酸贮存液。贮存液可以短期保存在 2-8℃，使用时 37℃条件下加热混匀后即可使用。

3. 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 300μM。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。

4. 待检细胞加入含油酸的完全培养液，37℃培养过夜。一般情况下，次日即可观察到囊泡状脂滴。

油酸钠 BSA 高脂细胞添加剂（PWL220）使用具体方法如下：

1. PWL220 的有效成分是油酸钠（Sodium stearate），浓度是 12mM。将本品完全融化后，使用细胞的完全培养液稀释至 300μM-500μM。

2. 待检细胞加入含油酸钠的完全培养液，37℃培养 24-48h，即可观察到囊泡状脂滴。

（二）染色工作液的配制（以 1000×稀释为例）

由于不同细胞种类、细胞密度的染色条件不同，建议自行摸索 Nile Red 和 Hoechst 33342 的最适浓度。一般来说，满足信号足够的前提下，尽可能选择最低浓度的染料剂量。

根据样品数量和每个样品所需工作液的体积，计算出染色工作液的总体积。对于 6、12、24、96 孔板，每孔检测工作液的用量分别为 0.5~1mL、200~500μL、100~250μL 和 50~100μL；对于流式细胞样品，每个样品的染色工作液的体积为 0.5mL。

下述按照 1:1000 稀释倍数/1mL 举例：

取出 Nile Red（1000×）、Hoechst 33342（1000×）和 Assay Buffer 完全融化，平衡至室温。参考下表配制适量的染色液，涡旋震荡混匀制成染色工作液。

Reagent	1mL
Nile Red（1000×）	1μL
Hoechst 33342（1000×）	1μL
Assay Buffer	998μL

配制好的染色工作液必须一次使用完毕，不建议冻存或 2-8℃保存后继续使用。染色液中 Nile Red 的最终浓度可以根据染色效果在 0.2×~2×之间适当调整。

（三）荧光显微镜检测

1. 接种培养：将细胞接种于 96 孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上，按实验设计对细胞进行一定处理。

2. 洗涤：对于贴壁细胞，吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 2 次；对于悬浮细胞，250-1000×g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 2 次。

3. 固定（选做）：加入 4%多聚甲醛固定液（MA0192）室温固定 10-15min。固定结束后，用 PBS 洗涤 1-2 次。

【注 1】：Nile Red 和 Hoechst 33342 适用于活细胞染色，也适用于固定后细胞的染色。但为了获得最佳的脂滴形态染色效果，在实验允许的情况下，建议将样品固定后再进行后续染色步骤。

【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。

4. 染色。吸除孔板内原有 PBS，加入适当体积的染色工作液。通常 96 孔板每孔加入 100μL，24 孔板每孔加入 250μL，12 孔板每孔加入 500μL，6 孔板每孔加入 1mL。室温避光孵育 10-20min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以 10min 作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。

5. 检测。孵育结束后，用 PBS 洗两遍。随后，使用荧光显微镜观察，Nile Red 选择使用 TRITC 滤光片，观察橙红色荧光；也可以使用 FITC 滤光片，观察绿色荧光；Hoechst 33342 观察蓝色荧光。如有需要，也可进一步进行其它荧光的复染，注意整个过程均需注意避光操作。

【注 4】：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。

（四）流式细胞仪检测

1. 细胞准备：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 400×g 室温离心 5min，弃上清，用 PBS 洗涤 1 次。每个样品推荐的细胞用量为 10^6 个细胞。

2. 固定（选做）：加入 4%多聚甲醛固定液（MA0192）室温固定 10-15min。

【注 1，2，3】：同上。

3. 洗涤：400×g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 1-2 次。

4. 染色：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 染色工作液，重悬为单细胞悬液，室温避光孵育 10-15min。孵育结束后，400×g 室温离心 5min，弃上清，用 PBS 洗涤 2 次。

5. 检测：400×g 室温离心 5min 沉淀细胞。吸净液体后，每个样品加入 0.5mL Assay Buffer 重悬细胞后用流式细胞仪检测（检测时参考探针光谱特征选择合适的检测条件，例如 Ex/Em=552/636nm 或 Ex/Em=485/535nm）。注意整个过程均需避光操作。染色后，尽量在 1h 内进行流式细胞仪检测和分析。

【注 5】：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 6】：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。

（五）荧光酶标仪检测

1. 接种培养。将细胞接种于 96 孔黑色多孔板中，每孔的细胞数需要控制在 100-10000 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。

2. 固定（选做）：加入 4%多聚甲醛固定液（MA0192）室温固定 10-15min。

【注 1，2，3】：同上。

3. 洗涤。对于贴壁细胞，吸除孔内原有液体，用 PBS 洗涤细胞 2 遍；对于悬浮细胞，250-1000×g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 2 遍。

4. 染色。加入适当体积的染色工作液，通常 96 孔板每孔加入 100μL。室温避光孵育 10-20min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以 10min 作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。

5. 检测。孵育结束后，用 PBS 洗涤细胞 2 遍。随后用荧光酶标仪检测（参考探针光谱特征，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）。

保存条件

-20℃避光保存，自生产之日起 12 个月有效。Assay Buffer 短期内可暂存 2-8℃，一个月内有效。

注意事项

1. 第一次使用请将本品分装并于-20℃冻存，避免反复冻融。建议根据单次用量分装密封保存。

2. 由于 Nile Red 的发射光谱范围广，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，可以先检测 Nile Red，并在淬灭后再进行其它荧光的检测。

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×~2×之间适当调整。

4. Nile Red 在激光照射下易发生淬灭，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. 为获得准确试验结果，建议样品在染色后 1 小时内进行分析。

6. 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。

7. Assay buffer 应在无菌环境中取用，否则可能会被微生物污染而影响使用效果，甚至无法继续使用。

8. 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。

9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

大连美仑生物技术有限公司
官网:https://www.meilunbio.com/
电话/邮箱:0411-62910999 sales@meilune.com
本产品仅供科研使用