

脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)

产品编号	产品名称	包装
C2051S	脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)	100-1000次
C2051M	脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)	500-5000次

产品简介:

- 碧云天的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[1]。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[2]。
- 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[3]。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[4]。Nile Red在磷脂中的激发光和发射光谱参考图1。

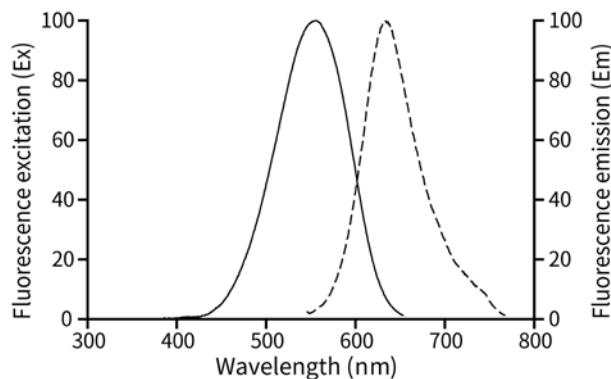


图1. Nile Red在磷脂中的激发光和发射光谱。

- 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。

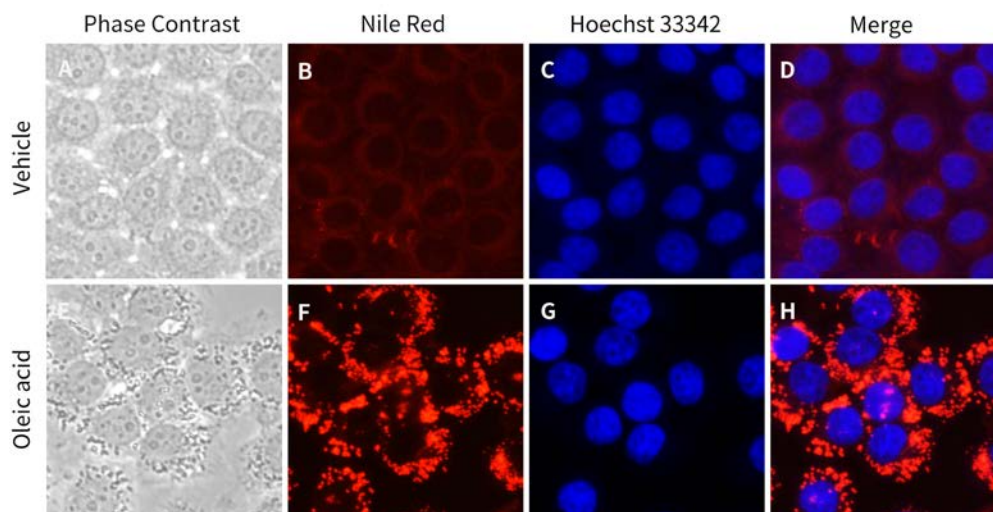


图2. 脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)检测HeLa细胞内脂滴的效果图。图A为正常HeLa细胞在显微镜明场下的形态, 正常细胞内无明显的脂滴聚集现象, 因此经Nile Red染色后呈较弱的红色荧光(图B), 主要是细胞膜上脂类的染色; 图E为使用油酸

(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100μl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。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C2051S-1	Nile Red (1000X)	0.1ml
C2051S-2	Hoechst 33342 (1000X)	0.1ml
C2051S-3	Assay Buffer	100ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C2051M-1	Nile Red (1000X)	0.5ml
C2051M-2	Hoechst 33342 (1000X)	0.5ml
C2051M-3	Assay Buffer	500ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C避光保存，至少一年有效。Nile Red (1000X)和Hoechst 33342 (1000X)须避光保存。

注意事项：

- 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[5]。
- 第一次使用时建议适当分装，避免反复冻融。
- 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0.2X-2X之间适当调整。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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 (1000X)	1μl	10μl	100μl
Hoechst 33342 (1000X)	1μl	10μl	100μl
Assay Buffer	998μl	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°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0.2X-2X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(P0099)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[4]。

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 (P0095)或Digitonin (ST1272)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10⁶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(P0099), 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[4]。
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 (P0095)或Digitonin (ST1272)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BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966), 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(P0099)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[4]。
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 (P0095)或Digitonin (ST1272)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。
- (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(ST2053)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。

参考文献:

1. Olzmann JA, Carvalho P. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019. 20(3):137-155.
2. Thiam AR, Farese RV Jr, Walther TC. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013. 14(12):775-86.
3. Rumin J, Bonnefond H, Saint-Jean B, Rouxel C, Sciandra A, et al. Biotechnol Biofuels. 2015. 8:42.

4. Listenberger LL, Brown DA. Curr Protoc Cell Biol. 2007. Chapter 24:Unit 24.2.
5. Ostermeyer AG, Paci JM, Zeng Y, Lublin DM, Munro S, Brown DA. J Cell Biol. 2001.152(5):1071-1078.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0157S	油红O染色试剂盒	50-250次
C0157M	油红O染色试剂盒	200-1000次
C0158S	改良油红O染色试剂盒	50-250次
C0158M	改良油红O染色试剂盒	200-1000次
C2051S	脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)	100-1000次
C2051M	脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)	500-5000次
C2053S	脂滴绿色荧光检测试剂盒(BODIPY 493/503)	100-1000次
C2053M	脂滴绿色荧光检测试剂盒(BODIPY 493/503)	500-5000次
ST2053-50μl	油酸(≥99%, BioReagent)	50μl
ST2053-250μl	油酸(≥99%, BioReagent)	250μl
ST2053-1ml	油酸(≥99%, BioReagent)	1ml

Version 2022.02.20