

脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)

货号: PMK1902

保存: -20℃避光保存 12 个月

规格: 100T-1000T/500T-5000T

适用样本: 细胞

产品简介

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。本试剂盒所使用的荧光探针为尼罗红(Nile Red),其在磷脂(phospho-lipid)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)。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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	100T-1000T	500T-5000T	
Nile Red (1000×)	100 μL	500 μL	-20℃, 避光保存
Hoechst 33342 (1000×)	100 μL	500 μL	-20℃, 避光保存
反应缓冲液	100mL	500mL	4℃

自备耗材

荧光显微镜或流式细胞仪或荧光酶标仪、离心机

细胞培养板、可调节式移液枪及枪头

PBS

试剂准备

Nile Red (1000×): 实验过程中冰上避光放置,分装-20℃避光保存,避免反复冻融。

Hoechst 33342 (1000×): 实验过程中冰上避光放置,分装-20℃避光保存,避免反复冻融。

反应缓冲液: 使用前预热到37℃。

染色溶液配制: 按每1mL反应缓冲液中加入1μL Nile Red (1000×)和1μL Hoechst 33342 (1000×)的比例配制,根据使用样本的数量按比例放大实验。

注意: 1. 各组分(小管试剂)开盖前,请先低速离心。

2. 配制好的染色溶液必须一次使用完毕,不建议冻存或4℃保存后继续使用。

3. 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。

4. 为得到比较理想的结果, 可根据细胞类型和实际染色效果对 Nile Red 的工作浓度、细胞量、孵育温度和时间等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。对于 96 孔板中的样品, 按照每孔使用 $100\ \mu\text{L}$ 染色液计算, 本试剂盒的 100T-1000T 和 500T-5000T 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 100T-1000T 和 500T-5000T 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 100T-1000T 和 500T-5000T 可以进行 100 次和 500 次检测。

实验步骤

A. 荧光显微镜检测

1. 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。

2. 固定(选做):

(1) 取出待检测的细胞, 使用 PBS 洗涤两遍, 吸除 PBS。

(2) 加入 4%多聚甲醛固定液 (PMK0240) 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。

3. 染色:

(1) 取出待检测的细胞, PBS 洗涤两遍。

(2) 吸除 PBS, 加入适当体积的染色溶液, 通常 96 孔板每孔加入 $100\ \mu\text{L}$, 24 孔板每孔加入 $250\ \mu\text{L}$, 12 孔板每孔加入 $500\ \mu\text{L}$, 6 孔板每孔加入 1mL 。室温下避光孵育 10-20 分钟。

(3) PBS 洗涤两遍。

4. 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。

B. 流式细胞仪检测:

1. 细胞准备:

(1) 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。

(2) $400\times g$ 室温离心 5 分钟, 弃上清。

2. 固定(选做):

(1) 加入 4%多聚甲醛固定液 (PMK0240), 轻轻吹打重悬为单细胞悬液, 室温固定 10-15 分钟。

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

(3) 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。

3. 染色:

(1) 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 染色溶液, 轻柔并充分重悬细胞, 室温避光孵育 10-15 分钟。

(2) $400\times g$ 室温离心 5 分钟, 弃上清。

(3) 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。

(4) 每孔加入 0.5mL PBS 重悬细胞。

4. 检测: 检测时参考其光谱特征选择合适的检测条件, 例如 $\text{Ex/Em}=552/636\text{nm}$ 或 $\text{Ex/Em}=485/535\text{nm}$ 。

注 1: 使用仅含反应缓冲液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。

C. 荧光酶标仪检测:

1. 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。

2. 固定(选做):

- (1) 取出待检测的细胞, 使用 PBS 洗涤两遍, 吸除 PBS。
- (2) 加入 4%多聚甲醛固定液 (PMK0240) 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。

3. 染色:

- (1) 取出待检测的细胞, 使用 PBS 洗涤两遍。
- (2) 吸除 PBS, 加入适当体积的染色溶液, 通常 96 孔板每孔加入 100 μ L。室温下避光孵育 10-20 分钟。
- (3) PBS 洗涤两遍。
4. 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。

D. 阳性对照的诱导方法:

油酸 (CAS: 112-80-1) 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:

1. 37°C 条件下加热油酸, 使其完全成为液体。
2. 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°C, 使用时 37°C 条件下加热混匀后即可使用。
3. 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 1: 500 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。

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

相关产品:

PMK0989 Calcein-AM/PI 活/死细胞双染色试剂盒

PMK0990 活细胞示踪试剂盒 (绿色荧光)

PMK0991 细胞周期染色试剂盒

PMK0992 EdU-488 法细胞增殖成像检测试剂盒

PMK0993 EdU-555 法细胞增殖成像检测试剂盒

更多产品详情了解, 请关注公众号:

