

## 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。

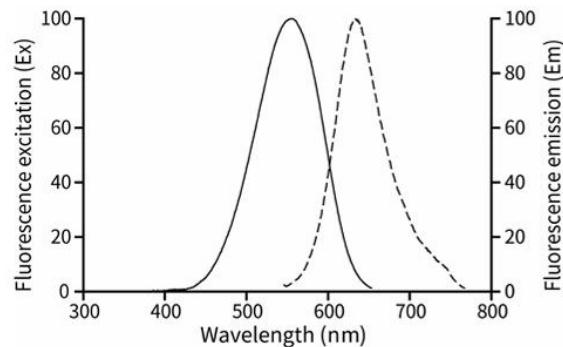


图1. Nile Red在磷脂中的激发光和发射光光谱。

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。

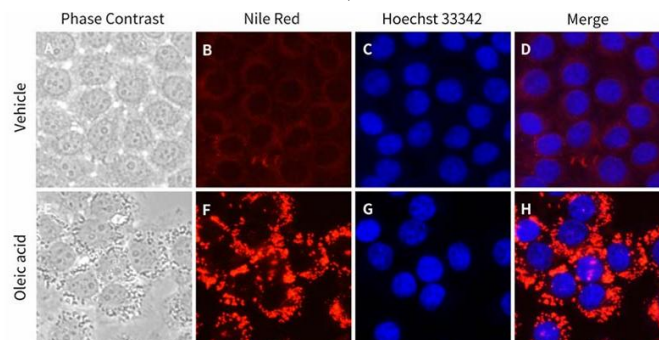


图2. 脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)检测HeLa细胞内脂滴的效果图。图A为正常HeLa细胞在显微镜明场下的形态，正常细胞内无明显的脂滴聚集现象，因此经Nile Red染色后呈较弱的红色荧光(图B)，主要是细胞膜上脂类的染色；图E为使用油酸 (Oleic acid)诱导后细胞在显微镜明场下形态，此时细胞内有很明显的脂滴聚集，细胞内脂滴被Nile Red染成明亮的红色荧光(图F)。图C、G为细胞核染色效果，图D、H为脂滴和细胞核的叠加图。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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 $\mu$ 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 $\mu$ l	10 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Hoechst 33342 (1000 $\times$ )	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Assay Buffer	998 $\mu$ 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。

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



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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 $\mu$ l，24孔板每孔加入250 $\mu$ l，12孔板每孔加入500 $\mu$ 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<sup>6</sup>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。

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

(c) PBS洗涤两遍。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

- 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°C 条件下加热油酸，使其完全成为液体。
  - b. 取 48 $\mu$ l 的油酸，加入到 952 $\mu$ 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。
  - 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 $\mu$ M。
  - d. 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。
  - e. 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。

#### 储存条件：

-20°C 避光保存，至少一年有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com