

心磷脂绿色荧光染色试剂盒(NAO)

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|-------------------|-----------|
| C1872S | 心磷脂绿色荧光染色试剂盒(NAO) | 100-1000次 |
| C1872M | 心磷脂绿色荧光染色试剂盒(NAO) | 500-5000次 |

产品简介:

- 碧云天的心磷脂绿色荧光染色试剂盒(NAO) (Cardiolipin Green Fluorescence Staining Kit with NAO)是一种以NAO (Nonyl Acridine Orange)为荧光探针,快速灵敏地染色细胞、组织或纯化的线粒体中的心磷脂的试剂盒。本试剂盒可以用于线粒体内膜的荧光标记、检测线粒体动态变化、解析心磷脂富集微域,以及通过荧光染色的强弱分析心磷脂水平的变化。本试剂盒可使用荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测系统进行检测。
- 心磷脂(Cardiolipin)是一种富集在真核细胞的线粒体内膜和部分细菌内膜(如革兰氏阴性菌)的磷脂分子,在维持线粒体和细菌膜的结构完整性以及调节膜的生物功能方面起着至关重要的作用。NAO对心磷脂具有高亲和性,是一种特异性结合心磷脂的荧光探针,通过与心磷脂的相互作用可显著增强荧光信号[1],常用于研究心磷脂的各种特性,例如通过荧光显微镜成像心磷脂[2]、检测细菌中的心磷脂富集微域[3],在凋亡过程中观察线粒体心磷脂定位和水平的变化[4]。本试剂盒适用于染色和分析线粒体和某些原核生物中的心磷脂,尤其在标记线粒体及心磷脂富集区域、评估细胞凋亡、线粒体损伤和能量代谢等生物过程中具有广泛应用。
- NAO (10-Nnonyl acridine orange), 中文名称10-N-壬基吖啶橙, CAS号为75168-11-5, 分子式为 $C_{26}H_{38}BrN_3$, 分子量为472.5, 在无水乙醇中的最大激发波长为498nm, 最大发射波长为521nm。NAO的化学结构式和在水乙醇中的激发、发射光谱参考图1。

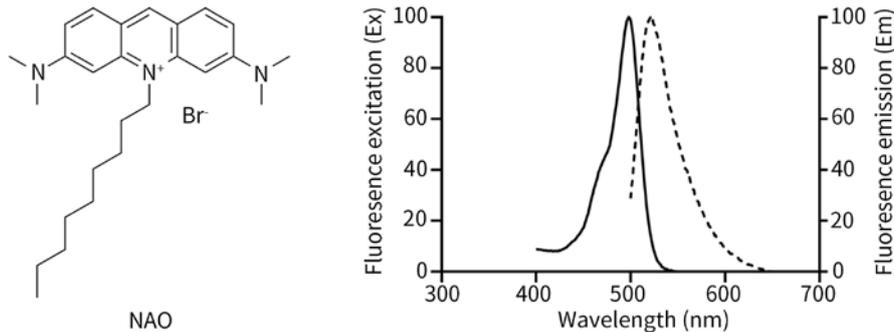


图1. NAO的化学结构式和在水乙醇中的激发、发射光谱图。

- 本试剂盒染色心磷脂的原理如下。心磷脂具有独特的分子结构特征,包括四条脂肪链和相对较小的头基,使其能够特异性结合NAO。结合后,NAO的荧光强度显著增强。由于NAO同时具有亲脂性和正电荷,在线粒体膜电位的作用下,它可以穿过线粒体外膜并定位于富含心磷脂的内膜区域,实现对线粒体内膜的高特异性荧光标记。因此NAO可以用于标记心磷脂并监测线粒体的动态变化。
- 本试剂盒可以应用于大多数的真核细胞,包括某些酵母如*Saccharomyces cerevisiae*,以及原核细胞(如革兰氏阴性菌和沙眼衣原体)。NAO是吖啶橙的衍生物,可穿透正常完整的细胞,NAO在线粒体内的积累依赖于线粒体膜电位[2],因此本试剂盒采用高纯度、高品质的探针,专为检测活细胞或组织设计,具有良好的兼容性,可适用于后续的细胞固定和通透处理。然而,需注意在染色后进行固定和通透操作可能会导致荧光信号有所减弱。
- 本试剂盒提供的NAO为1000X溶液,该溶液经过优化,对大多数细胞都适用,但为了得到满意的结果,对于不同类型的细胞请自行进行一定摸索,NAO的终浓度一般为0.5X-2X,最优的推荐终浓度为1X。本试剂盒提供了染色细胞核的Hoechst 33342,以方便染色观察所有的细胞核。同时,本试剂盒提供了Staining Buffer,该Staining Buffer可在一段时间内维持细胞的正常状态,并给细胞提供一定的营养,通常效果比PBS或HBSS更好。
- 使用本试剂盒检测NRK-52E细胞线粒体的效果参考图2。

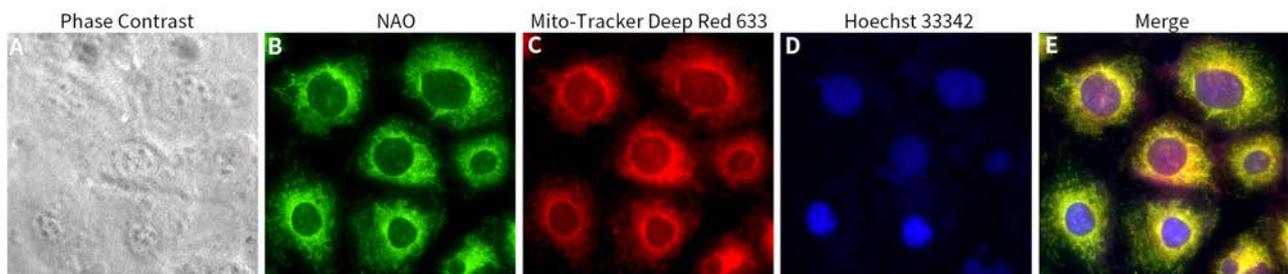


图2. 碧云天心磷脂绿色荧光染色试剂盒(NAO) (C1872)的检测效果图。正常的NRK-52E中, NAO在线粒体内聚集发出明亮的绿色荧光(图B), 与Mito-Tracker Deep Red 633 (线粒体深红荧光探针) (C1034) (图C)表现出良好的共定位(图E)。Hoechst 33342呈现细胞核染色(图D)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异, 本图仅供参考。

- 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, 本试剂盒的小包装和中包装可以进行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, 本试剂盒的小包装和中包装可以进行100次和500次检测。

包装清单:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|-----------------------|-------|
| C1872S-1 | NAO (1000X) | 0.1ml |
| C1872S-2 | Hoechst 33342 (1000X) | 0.1ml |
| C1872S-3 | Staining Buffer | 100ml |
| — | 说明书 | 1份 |

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|-----------------------|-------|
| C1872M-1 | NAO (1000X) | 0.5ml |
| C1872M-2 | Hoechst 33342 (1000X) | 0.5ml |
| C1872M-3 | Staining Buffer | 500ml |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。NAO (1000X)和Hoechst 33342 (1000X)须避光保存。

注意事项:

- 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。
- 本试剂盒仅限于进行存活的细胞、组织或线粒体的检测, 不可用于固定或冻存的细胞、组织或线粒体样品的检测。
- Staining Buffer经过过滤除菌处理, 在使用时须注意避免微生物污染, 否则很可能严重影响染色效果。如果Staining Buffer发生浑浊等明显的微生物污染, 就不能继续使用。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板, 建议使用96孔黑板(碧云天的FCP966 BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装))。
- 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. NAO染色工作液的配制。

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NAO染色液(NAO Staining Solution), 并充分混匀。

| Reagent | 1 Sample | 10 Samples | 100 Samples |
|------------------------------|-------------|-------------|--------------|
| NAO (1000X) | 1 μ l | 10 μ l | 100 μ l |
| Hoechst 33342 (1000X) | 1 μ l | 10 μ l | 100 μ l |
| Staining Buffer | 998 μ l | 9.98ml | 99.8ml |
| NAO Staining Solution | 1ml | 10ml | 100ml |

注1: 配制NAO染色液时注意避光, 且须现配现用, 不能长期保存。

注2: 如有必要, Staining Buffer也可用细胞培养液代替; 对于纯化的线粒体, 可使用线粒体储存缓冲液代替Staining Buffer。

注3: NAO染色液中NAO的最终浓度须根据不同细胞系和实验体系通过预实验进行优化。NAO的推荐工作浓度为1X, 通常可以在0.5X-2X范围内摸索最佳工作浓度。

2. 对于悬浮细胞。

- 细胞按照实验设计进行一定处理后, 计数。取适量细胞600 \times g室温离心5分钟, 弃上清, 加入适当体积的NAO染色工液重悬细胞, 使细胞密度约为1 \times 10⁶/ml。
- 细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育15-45分钟, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以15分钟作为初始孵育时间, 对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。
- 37 $^{\circ}$ C孵育结束后, 600 \times g室温离心5分钟, 沉淀细胞。吸除上清, 注意尽量不要触及细胞。
- 用37 $^{\circ}$ C预热的细胞培养液洗涤2次。具体操作为: 加入1ml 37 $^{\circ}$ C预热的细胞培养液重悬细胞, 600 \times g离心5分钟, 沉淀细胞, 弃上清; 再加入1ml 37 $^{\circ}$ C预热的细胞培养液重悬细胞, 600 \times g离心5分钟, 沉淀细胞, 弃上清。
- 加入适量细胞培养液重悬后, 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察, 也可以用荧光酶标仪或流式细胞仪分析。

3. 对于贴壁细胞。

注: 对于贴壁细胞, 如果希望采用荧光酶标仪或流式细胞仪检测, 可以先收集细胞, 重悬后参考悬浮细胞的检测方法。荧光酶标

仪也可以使用96孔板等进行贴壁培养检测。

- a. 对于6孔板的一个孔的细胞，吸除培养液，根据具体实验如有必要可以用PBS或其它适当溶液洗涤细胞一次。
- b. 加入1ml NAO染色液。细胞培养箱中37°C孵育15-45分钟，不同的细胞最佳孵育时间不同。以15分钟作为初始孵育时间，对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。
- c. 37°C孵育结束后，吸除上清，用预热的细胞培养液洗涤2次。
- d. 加入2ml预热的细胞培养液，培养液中可以含有血清和酚红。
- e. 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

4. 对于纯化的线粒体。

- a. 对于纯化的线粒体，可使用线粒体储存缓冲液来配制NAO染色工作液。0.9ml NAO染色工作液中加入0.1ml总蛋白量为10-100µg纯化的线粒体。具体的染色请适当参考细胞的染色方法进行。
- b. 混匀后直接用荧光分光光度计对NAO进行时间扫描(Time scan)，激发波长为498nm，发射波长为521nm。或者用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察。

5. 荧光观测和结果分析。

NAO为绿色荧光，最大激发波长为498nm，最大发射波长为521nm；Hoechst 33342为蓝色荧光，最大激发波长为346nm，最大发射波长为460nm。

注：此处测定荧光时不必把激发光和发射光波长设置在最大激发波长和最大发射波长，应根据仪器的荧光滤光片配置和多色成像需求进行选择。此处的阴性对照为仅含Staining Buffer的未经染色的细胞样品。

参考文献：

1. Petit JM, Maftah A, Ratinaud MH, Julien R. Eur. J Biochem. 1992. 209(1):267–273.
2. Jacobson J, Duchon MR, Heales SJ. J Neurochem. 2002. 82(2):224–233.
3. Mileykovskaya E, Dowhan W. J Bacteriol. 2000.182(4):1172-5.
4. Garcia FM, Troiano L, Moretti L, Nasi M, et al. Cell Growth Differ. 2002.13(9):449–455.

相关产品：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|-------------------|---|---------------------|
| C1005/C1006 | DAPI染色液 | 10ml/50ml |
| C1017/C1018 | Hoechst 33258染色液 | 10ml/50ml |
| C1025/C1026 | Hoechst 33342染色液 | 10ml/50ml |
| C1027/C1028/C1029 | Hoechst 33342活细胞染色液(100X) | 0.1ml/0.5ml/3ml |
| C1032 | Mito-Tracker Deep Red FM (线粒体深红荧光探针) | 50µg/250µg |
| C1034 | Mito-Tracker Deep Red 633 (线粒体深红荧光探针) | 50µg/250µg |
| C1035 | Mito-Tracker Red CMXRos (线粒体红色荧光探针,高纯度) | 50µg/250µg |
| C1048 | Mito-Tracker Green (线粒体绿色荧光探针) | 50µg |
| C1049B | Mito-Tracker Red CMXRos (线粒体红色荧光探针) | 50µg/250µg |
| C1071 | 线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒 | 20次/50次 |
| C1872 | 心磷脂绿色荧光染色试剂盒(NAO) | 100-1000次/500-5000次 |
| C2001S | 线粒体膜电位检测试剂盒(TMRE) | 100-1000次 |
| C2003S | 增强型线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1) | >100次 |
| C2006 | 线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1) | >100次 |
| C2008S | 线粒体膜电位检测试剂盒(Rhodamine 123) | 100-1000次 |
| C2009S | 线粒体通透性转换孔(MPTP)检测试剂盒 | 100-1000次 |
| C3601 | 细胞线粒体分离试剂盒 | 50-100次 |
| C3606 | 组织线粒体分离试剂盒 | 50-100次 |
| D2606 | pCMV-Mito-AT1.03 (线粒体ATP荧光探针) | 1µg/100µg |
| S0061 | 线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSOX Red) | 20-200次/100-1000次 |
| S1062 | 线粒体钙离子检测试剂盒(Rhod-2 AM) | 200次/1000次 |

Version 2025.03.19