

# 心磷脂绿色荧光染色试剂盒(NAO)

Cat NO: IMFP-C012

## 产品简介

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，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、检测细菌中的心磷脂富集微域，在凋亡过程中观察线粒体心磷脂定位和水平的变化。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<sub>26</sub>H<sub>38</sub>BrN<sub>3</sub>，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。

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，本试剂盒可以进行 20 次、50 次和 100 次检测。

## 产品信息

表 1.产品信息

| 产品名称              | 产品规格         | 储存条件 | 保质期   |
|-------------------|--------------|------|-------|
| 心磷脂绿色荧光染色试剂盒(NAO) | 20T/50T/100T | -20℃ | 12 个月 |

## 产品组成

表 1.组成信息

| 产品名称                  | 20T        | 50T        | 100T        |
|-----------------------|------------|------------|-------------|
| NAO (1000X)           | 20 $\mu$ L | 50 $\mu$ L | 100 $\mu$ L |
| Hoechst 33342 (1000X) | 20uL       | 50 $\mu$ L | 100 $\mu$ L |
| Staining Buffer       | 20mL       | 50mL       | 100mL       |

## 产品优势

特异性：NAO 可特异性结合线粒体内膜心磷脂，适用于早期凋亡检测。

兼容性：该方法可与线粒体膜电位检测（如TMRE）或细胞色素 c 释放实验联用，提供多维度凋亡分析。

## 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 $\mu$ l   | 10 $\mu$ l | 100 $\mu$ l |
| Hoechst 33342 (1000X) | 1 $\mu$ l   | 10 $\mu$ l | 100 $\mu$ l |
| Staining Buffer       | 998 $\mu$ 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

a.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  $1 \times 10^6/ml$ 。

b.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。

c. $37^{\circ}C$  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。

d.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。

e.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  $37^{\circ}C$  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。

c. $37^{\circ}C$  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  $10-100\mu g$  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。

## 注意事项

- 1、NAO (1000X)和 Hoechst 33342 (1000X)须避光保存。
- 2、本产品仅限于专业人员的科学的研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
- 3、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 4、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。