



心磷脂绿色荧光染色(NAO)试剂盒说明书

产品说明:

- 1. 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。
- 2. 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 (10-N-nonyl acridine orange)，中文名称 10-N-壬基吖啶橙，NAO对3-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。
- 3. 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，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。

4. 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，最优先的推荐终浓度为 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。

包装清单：

产品名称	包装
NAO(1000X)	100 μ L
Hoechst33342	100 μ L
Staining Buffer	100mL
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：

1. 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。
2. 本试剂盒仅限于活的细胞、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。
3. 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。
4. 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。
5. 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 Sample	100 Sample
NAO(1000X)	1 μ l	10 μ l	100 μ l
Hoechst33342	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。

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 10⁶/ml。

b. 细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 不同的细胞最佳孵育时间不同。

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。



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 30 分钟。

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 10-100 μ 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，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。