



For research use only. Not for clinical diagnosis.

Lipid Assay Kit

Catalog No. AK09F

July, 1, 2024

Description

Oil red O stain is one of the methods for determination of differentiation in adipocyte. Oil red O, the oilphilic red dye, stains intracellular oil droplet. This lipid assay kit, consisting of cell fixative and oil red O solution, is used to stain the accumulated oil in adipocyte. Furthermore, this kit is able to quantify amount of oil with organic solvent extraction method.

Components/Storage

Component	Quantity	Storage
Oil red O solution	150 mL×2	room temperature
Solvent for Oil red O extraction	200 mL×2	room temperature

One kit contains reagents for 30 × 24well plates

Materials required but not provided

- 10% formalin or fixation

Preparation of reagents

- fixative solution

37 % formaldehyde	100 ml
Distilled or deionized water	900 ml
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	4 g
Na ₂ HPO ₄	6.5 g

- Oil red O working solution

1. Mix Oil red O solution and distilled water in the proportion of six to four and leave it for 10~15 minutes at room temperature.
2. Filtrate Oil red O working solution by 0.5~1.0µm syringe filter.

Note: The working solution is stable for no longer than 2 hours. The solution containing crystallized Oil red O cannot be used.

Protocols (24-well plate format)

1. Remove culture medium and wash each well once with 500 µL of PBS.
2. Add 500µL of Fixative to each well, fix it over night at room temperature.
3. After the fixation, wash each well three times with 500µL of distilled water.
4. Add 500µL of Oil red O solution to each well and leave at least for 15min in room temperature.
5. Remove Oil red O solution, wash each well three times with distilled water. Repeat until the distilled water is perfect clean.
6. Dry it and observe. In addition, add 500µL of extraction reagent to each well, measure dye extraction (540 nm) by spectrophotometer or plate reader.

Application example

Visceral adipocytes (PMC-VAC01-COS) were stained by Lipid Assay Kit.

Visceral adipocytes were stained with Oil red O solution (Figure 1), and then dye extractions were measured by spectrophotometer (540 nm) (Figure 2).

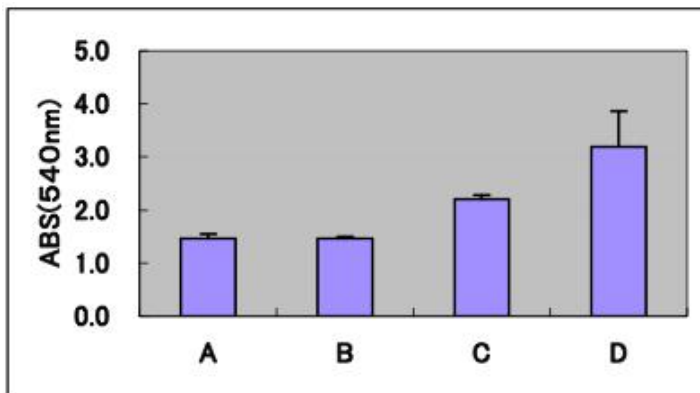


Figure 1

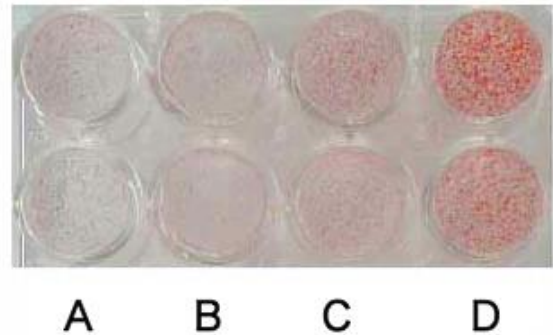


Figure 2

References

- (1) Tashiro, K., Inamura, M., Kawabata, K., Sakurai, F., Yamanishi, K., Hayakawa, T., Mizuguchi, H. Efficient Adipocyte and Osteoblast Differentiation from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells by Adenoviral Transduction. *Stem Cells*. 27, 1802-1811 (2009)



一般研究用キット

リピッドアッセイキット

(Lipid Assay kit, 品番 : AK09F)

2024年7月1日改訂

※本品は、研究目的にのみご使用ください。

脂肪細胞は、前駆細胞から未熟な脂肪細胞そして成熟脂肪細胞へと分化が進むにつれて、細胞内に中性脂肪を合成し脂肪球として蓄積します。そのため蓄積した脂肪球を評価することで脂肪細胞の分化の程度がわかります。

本キットは、親油性赤色色素であるオイルレッドOによって脂肪細胞内の脂肪球を赤く染めることができる染色キットです。さらに赤く染まった脂肪球を抽出液で抽出し、色素量を定量することによって中性脂肪量も推測することもできます。

《I-1. キット構成》

内容	容量	本数	保存温度
オイルレッドO 原液 Oil Red O Solution	150mL	2本	室温
抽出液 Solvent for Oil Red O Extraction	200mL	2本	室温

※本キットで、24 well プレート 30 枚分を測定することができます。

※お客様にご用意していただく試薬は、固定液（下記説明）、PBS、精製水を別途にご用意願います。

《I-2. キットの特徴》

- 細胞内の脂肪球を簡単に染色できる。
- 色素量から中性脂肪量の変動を測定できる。

《II. 固定液の調製》

固定液調整法

37%ホルムアルデヒド液（ホルマリン原液）	100 mL
精製水	900 mL
りん酸2水素ナトリウム・1水和物 (NaH ₂ PO ₄ ・H ₂ O)	4 g
りん酸水素2ナトリウム・無水 (Na ₂ HPO ₄)	6.5 g

市販試薬をご購入の場合は、10%中性緩衝ホルマリン液（和光純薬工業株式会社製、組織固定用1L、Cat.No.062-01661 または同等品）にて使用可能です。

《Ⅲ-1. 測定方法 –24well プレートを使用した場合–》

- (1) 24 ウェルプレートで培養した脂肪細胞をご用意ください。
- (注意) これ以降の作業は、培養面から脂肪細胞が剥がれやすい状態のため注意深く行ってください。
- (2) 培養液を除去後、1 ウェルあたり 500 μ L の PBS で 1 回洗浄してください。
- (3) 1 ウェルあたり固定液を 500 μ L 加え、室温で 1 晩固定してください。
- (4) 固定後、1well あたり精製水 500 μ L で洗浄して下さい。
- (5) 《Ⅲ-2. オイルレッド O 液の調製》に従ってオイルレッド O 液の調製してください(用時調製)。
- (6) 各ウェルに(5)のオイルレッド O 液を 500 μ L ずつ分注し、室温で 15 分間静置して下さい。
- (7) 15 分後オイルレッド O 液を除去し、1 ウェルあたり精製水で 3 回以上洗浄してください。洗浄水が透明になるまでよく洗浄して下さい。
- (8) 洗浄後、蒸留水を加えて観察してください。脂肪球が大きい細胞は、乾燥しても観察が可能です。脂肪球が小さい細胞では、膜が破れ脂肪が融合し、形状崩壊することがあります。
- (9) 脂肪滴の定量は、乾燥させたウェル内に抽出液を 500 μ L 加えて色素を溶出させます。溶出させる時間は、30 分から 2 時間程度です。溶出させた溶液を、分光光度計で波長 540nm における吸光度を測定して下さい。分光光度計の検出限度を超える場合は、抽出液で希釈して再測定して下さい

《Ⅲ-2. オイルレッド O 液の調製》

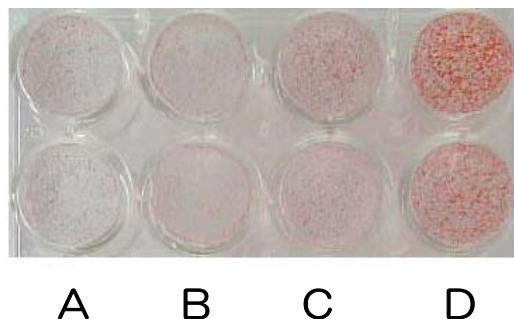
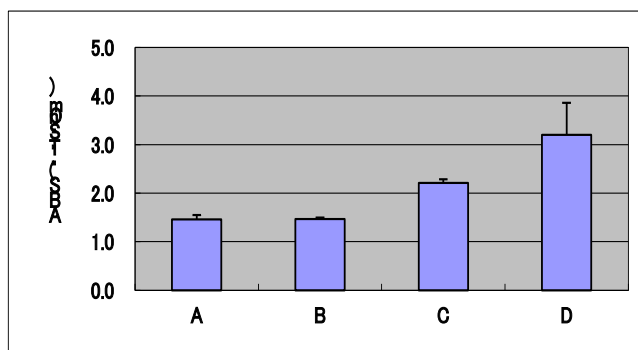
オイルレッド O 液は、用事調製のため使用前に以下の通りに調製してください。

- (1) オイルレッド O 原液：精製水を 6：4 の比率で混合し、室温で 10~15 分間静置して下さい。
- (2) その後、孔径 0.5~1.0 μ m のメンブランフィルターでろ過し、ろ液をオイルレッド O 液とします。
※オイルレッド O 液は、調製後 1~2 時間以内にご使用ください。析出が生じた場合はご使用することができません。

《Ⅳ. 脂肪定量の例》

各試料に対する脂肪細胞の影響について、ラット内臓脂肪細胞を用いて検討をおこなった結果になります。各試料で培養し脂肪滴の蓄積量を本キットで検出しました。

オイルレッド O 染色した腸間膜脂肪細胞(右図)と、引き続き抽出液で溶出し波長 540nm で測定した結果(左図)になります。



《Ⅴ. 参考文献》

- (1) Tashiro, K., Inamura, M., Kawabata, K., Sakurai, F., Yamanishi, K., Hayakawa, T., Mizuguchi, H. Efficient Adipocyte and Osteoblast Differentiation from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells by Adenoviral Transduction. Stem Cells. 27, 1802-1811 (2009)