



Adipocyte Fluorescent Staining kit

Catalog No. AK19F

July 1, 2024

Introduction

The Adipocyte Fluorescent Staining Kit (Cat.No.AK19F) is designed to stain both lipid droplets and nuclei in adipocytes using BODIPY® (Invitrogen Corporation) and H33258, respectively. Furthermore, the amount of lipid per cell and cell shape can be quantified using imaging instrument such as IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare Company)

Components

Component	Quantity	Storage
Tablet for washing	5 tablets	4-10°C
BODIPY®	50mL	4-10°C
H33258	50mL	4-10°C
mounting agent	50mL	4-10°C

One kit contains reagents for 10 × 96-well plates

Additional Materials Required

• 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

Preparation of washing buffer

Add one **Tablet for washing** to 100 ml of distilled or deionized water and mix.

Note: This working solution can be stored at 4°C for 7 days.

Protocol (96-well plate format)

1. Remove culture medium. Wash each well once with 100uL of washing buffer.
2. Add 50uL of fixative solution to each well and fix overnight at room temperature.
3. Remove fixative solution. Wash each well with 100uL of washing buffer. (× 2 times)
4. Add 50uL of BODIPY to each well and incubate for 30 minutes at room temperature.
5. Remove BODIPY. Add 50uL of H33258 to each well and incubate for 30 minutes at room temperature.
6. Remove H33258. Wash each well once with 100uL of washing buffer.
7. Add 50uL of mounting agent to each well.
8. Examine the sample by fluorescence microscope.

Note: For detection of lipid droplets, examine cells with an excitation filter of 498 nm and an emission filter of 503 nm.

For detection of nucleus, examine cells with an excitation filter of 352 nm and an emission filter of 461 nm.

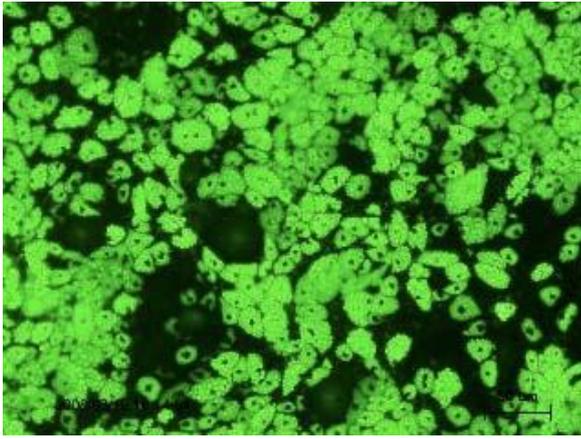


Figure 1: BODIPY staining of lipid droplets

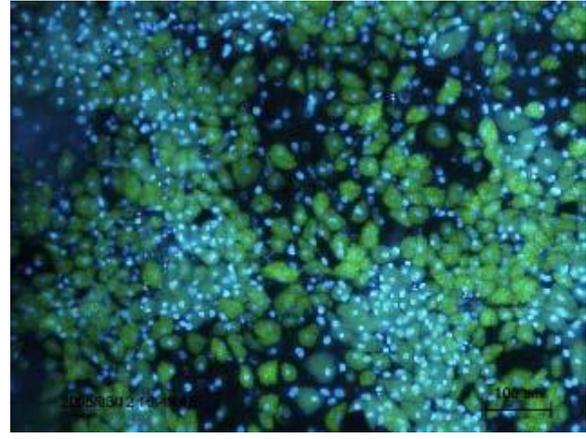


Figure 2: H33258 staining of nuclei

References

- (1) Sunao Takesita, Keisuke Kaji, Akira Kudo. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* Volume 15, Number 8 (2000). 1477-1488.
- (2) BEN A. A. SCHEVEN, JONE S. MILNE, SIMON P. ROBINS. A SEQUENTIAL CULTURE APPROACH TO STUDY OSTEOCLAST DIFFERENTIATION FROM NONADHERENT PORCINE BONE MARROW CELLS. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* July-August (1998). *Animal* 34: 568-577.



一般研究用キット

脂肪細胞蛍光染色キット

(Adipocyte Fluorescent Staining kit, 品番 : AK19F)

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。

培養細胞の脂肪球染色として、色素染色であるオイルレッド O 染色法が使用されていますが、本キットは2種類の蛍光色素を用いて細胞内の脂肪球を BODIPY[®](*)、核を H33258 で二重染色できる脂肪細胞染色キットになります。

本キットは別売の白色脂肪細胞培養キット、褐色脂肪細胞培養キット、腸間膜脂肪細胞培養キットのオプションキットとして開発された脂肪染色キットです。また IN Cell Analyzer 1000 (GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社) などを使用することによって細胞当たりの脂肪の量、形状などを数値化することが可能です。

(*) BODIPY は Invitrogen Corporation の登録商標です。

《I. キット構成》

内容	容量	本数	保存温度
洗浄液用タブレット Tablet for washing	100ml 用	5 個	4~10°C
脂肪球染色液 Lipid droplet stain solution (BODIPY [®])	50ml	1 本	4~10°C
核染色液 (H33258) Nuclear stain solution	50ml	1 本	4~10°C
封入剤 Mounting Reagent	50ml	1 本	4~10°C

※本キットで、96well プレート 10 枚分を使用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)、精製水を別途にご用意願います。

《II-1. 固定液の調製》

固定液調製法

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 1 L、Cat.No.062-01661 または同等品) にて使用可能です。

《II-2. 洗浄液の調製》

洗浄液の調製は、洗浄液用タブレットを 1 個につき 100ml の精製水で溶解します。洗浄液の保存および使用期間は、4°C で 1 週間になります。

《Ⅲ-1. 染色方法 —96well プレートを使用した場合—》

(1) 目的の細胞を培養した 96well プレートをご用意ください。ウェル内の培養液を除去後、100 μ リットルの洗浄液で各ウェルを1回洗浄してください。

(注意1) 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) 各ウェルに固定液を 50 μ リットル加え、室温で一晩固定してください。

(3) ウェル内の固定液を除去後、各ウェルに洗浄液 100 μ リットルで2回洗浄して下さい。

(4) 各ウェルに脂肪球染色液 50 μ リットルずつ分注し、室温で30分間静置して下さい。

(注意2) 脂肪球染色液は使用する前に 37 $^{\circ}$ Cに加熱し、ボトルを良く振ってからご使用ください。

(5) ウェル内から脂肪球染色液を除去後、核染色液を 50 μ リットルずつ分注し、室温で30分間静置して下さい。

(6) ウェル内から核染色液を除去し、各ウェルに洗浄液 100 μ リットルで1回洗浄して下さい。

(7) 各ウェルに封入剤を 50 μ リットルずつ分注してください。

(8) 蛍光顕微鏡で細胞を観察してください。

脂肪球を観察する場合は、励起波長 498 nm、蛍光波長 503 nm を満たすフィルターを選択してください。

核を観察する場合は、励起波長 352 nm、蛍光波長 461 nm を満たすフィルターを選択してください。

《Ⅲ-2. 染色結果》

本キットを使用してラット由来の内臓脂肪細胞を染色させた結果が下図（図1は脂肪球染色、図2は核染色）になります。

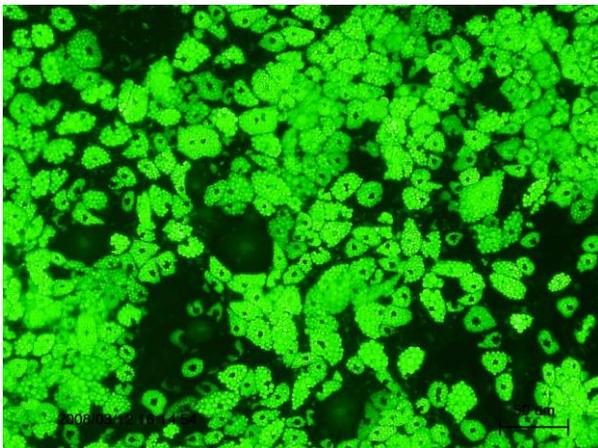


図1

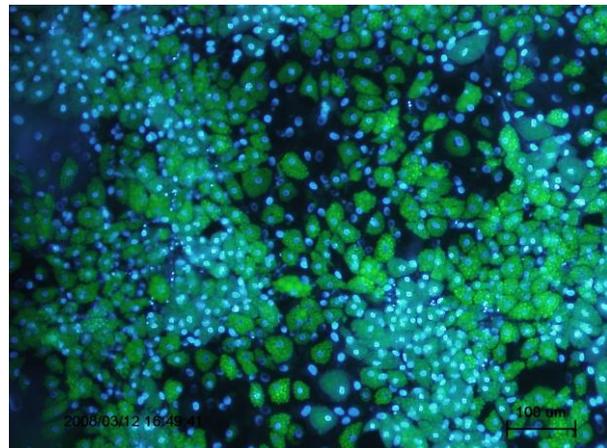


図2

《Ⅳ. 参考文献》

- (1) Sunao Takesita, Keisuke Kaji, Akira Kudo. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH Volume 15, Number 8 (2000). 1477-1488.
- (2) BEN A. A. SCHEVEN, JONE S. MILNE, SIMON P. ROBINS. A SEQUENTIAL CULTURE APPROACH TO STUDY OSTEOCLAST DIFFERENTIATION FROM NONADHERENT PORCINE BONE MARROW CELLS. In Vitro Cell. Dev. Biol. July-August (1998). Animal 34: 568-577.