荧光法脂质过氧化检测试剂盒(BODIPY 581/591 C11)

产品编号：MA1700　　规格：100-1000T / 500-5000T

产品内容

产品组成	MA1700-1 100-1000T	MA1700-2 500-5000T
BODIPY 581/591 C11 (2mM)	100μL	500μL
LpoUp (1000×)	20μL	100μL
说明书	1 份	1 份

产品简介

脂质过氧化（Lipid peroxidation, LPO）是诸多病理损伤中的关键环节，能够破坏膜蛋白结构、抑制其功能，引发细胞稳态失衡与组织损伤，与多种疾病密切相关。大量脂质过氧化物蓄积是铁死亡的核心特征。铁死亡（Ferroptosis）属于铁依赖型调控性细胞死亡（Regulated cell death, RCD），区别于经典细胞凋亡；在细胞抗氧化系统失活条件下，二价铁介导膜磷脂（含多不饱和脂肪酸酰基链）发生过氧化，造成生物膜破损，启动铁死亡程序。

荧光法脂质过氧化检测试剂盒(BODIPY 581/591 C11)，即 Lipid Peroxidation Fluorescence Assay Kit(BODIPY 581/591 C11)，是一种基于脂溶性比率型氟硼荧（BODIPY）类荧光探针 BODIPY 581/591 C11（CAS: 217075-36-0）来检测细胞内脂质过氧化状态的试剂盒。BODIPY 581/591 C11 为脂肪酸类似物，可嵌入细胞膜磷脂双分子层，专用于检测脂质过氧化，是铁死亡研究中广泛使用的经典探针。BODIPY 581/591 C11 还原态显红色荧光（Ex=581nm, Em=591nm），与脂质结合氧化后光谱蓝移呈绿色荧光（Ex=488nm, Em=510nm），可通过绿/红荧光比值定量脂质过氧化程度。

本试剂盒包含以下主要组分：BODIPY 581/591 C11 (2mM)和 LpoUp (1000×)。本试剂盒适用于荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪等荧光检测系统。

对于 96 孔板中的样品，按照每孔使用 100μL 染色液计算，本试剂盒的小包装 MA1700-1 和中包装 MA1700-2 分别可以进行 1000 次和 5000 次检测；对于 35mm 共聚焦专用玻璃皿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 MA1700-1 和中包装 MA1700-2 可以进行 100 次和 500 次检测。

保存条件

-20℃保存，自生产之日起 12 个月有效。BODIPY 581/591 C11 (2mM)须避光保存，-80℃可保存更长时间。

使用方法

（一）阳性对照的诱导方法

LpoUp (1000×)可以诱导培养细胞内脂质过氧化生成，作为阳性对照，使用具体方法如下：

1. 取试剂盒中提供的 LpoUp (1000×)，推荐按照 1:1000 的比例用 PBS 或 D-Hank's 进行稀释，随后孵育细胞 3 小时。

2. 对于特定的细胞，LpoUp 作用浓度和作用时间可能有所不同，需自行摸索最佳工作浓度和作用时间，甚至某些细胞可能对 LpoUp 不敏感。

（二）染色工作液的配制（以 1000×稀释为例）

由于不同细胞种类、细胞密度的染色条件不同，建议自行摸索 BODIPY 581/591 C11 的最适浓度。一般来说，满足信号足够的前提下，尽可能选择最低浓度的染料剂量。

根据样品数量和每个样品所需工作液的体积，计算出染色工作液的总体积。对于 6、12、24、96 孔板，每孔检测工作液的用量分别为 0.5~1mL、200~500μL、100~250μL 和 50~100μL；对于 4 宫格共聚焦专用玻璃皿，每孔检测工作液的用量推荐 0.5mL；35mm 共聚焦专用玻璃皿，每孔检测工作液的用量推荐 1mL。

下述按照 1:1000 稀释倍数/1mL 举例：

取出 BODIPY 581/591 C11 (2mM)完全融化，平衡至室温。参考下表配制适量的染色液，涡旋振荡混匀制成染色工作液。注意避光操作。

Reagent	1mL
BODIPY 581/591 C11 (2mM)	1μL
PBS 或 D-Hank's	999μL

配制好的染色工作液必须一次使用完毕，不建议冻存或 2-8℃保存后继续使用。染色液中 BODIPY 581/591 C11 的最终浓度可以根据染色效果在 0.4μM~4μM（0.2×~2×）之间适当调整。

【注 1】：BSA 和酚红(Phenol red)对本荧光探针的检测有干扰，需避免，建议使用 PBS 或 D-Hank's 进行染色工作液配制。

（三）荧光显微镜检测

1. 接种培养：将细胞接种于共聚焦专用玻璃皿或者细胞爬片上，按实验设计对细胞进行一定处理。

2. 洗涤：吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 2 次。

3. 染色：吸除孔板内原有 PBS，加入适当体积的染色工作液。通常 4 宫格共聚焦专用玻璃皿每孔加入 500μL，35mm 共聚焦专用玻璃皿每孔加入 1mL，6 孔板每孔加入 1mL。37℃避光孵育 10~40min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以 10min 作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。

4. 检测：孵育结束后，用 PBS 洗两遍。随后，使用荧光显微镜观察，BODIPY 581/591 C11 还原态显红色荧光（Ex=581nm, Em=591nm），与脂质结合氧化后光谱蓝移呈绿色荧光（Ex=488nm, Em=510nm），可通过绿/红荧光比值定量脂质过氧化程度。如有需要，也可进一步进行其他荧光的复染，注意整个过程均需注意避光操作。

【注 2】：BODIPY 581/591 C11 在 488nm 激光照射下易发生氧化淬灭，导致共轭基团断裂：红色荧光下降、绿色荧光增强，造成假阳性，因此荧光显微镜检测时建议先拍红色荧光，再拍绿色荧光。

【注 3】：使用荧光显微镜拍照时，为了减少荧光淬灭，尽可能降低荧光显微镜的激发光强度，缩短拍照时间。

（四）流式细胞仪检测

1. 接种培养：将细胞接种于 12 孔板等多孔板、细胞培养皿中，按实验设计对细胞进行一定处理。

2. 洗涤：吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 2 次。

3. 染色：吸除孔板内原有 PBS，加入适当体积的染色工作液。通常 96 孔板每孔加入 100μL，24 孔板每孔加入 250μL，12 孔板每孔加入 500μL，6 孔板每孔加入 1mL。37℃避光孵育 10~40min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以 30min 作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。

4. 细胞准备：吸除染色工作液，用 PBS 洗涤细胞 2 次，胰酶消化贴壁细胞后用培养液重悬。

5. 检测：400×g 室温离心 5min 沉淀细胞。吸净液体后，每个样品加入 0.2mL PBS 重悬细胞后用流式细胞仪检测。检测时参考探针光谱特征选择合适的检测条件，例如 BODIPY 581/591 C11 还原态显红色荧光（Ex=581nm, Em=591nm），与脂质结合氧化后光谱蓝移呈绿色荧光（Ex=488nm, Em=510nm）。注意整个过程均需避光操作。染色后，尽量在 1h 内进行流式细胞仪检测和分析。

【注 4】：使用仅含 PBS 并且未经染色的细胞样品用于流式细胞仪的阴性对照设置。

【注 5】：由于流式检测比较灵敏，使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低，此时可根据细胞类型和实际染色情况对 BODIPY 581/591 C11 的稀释倍数进行适当调整。

注意事项

1. 第一次使用请将本品分装并于-20℃冻存，避免反复冻融。建议根据单次用量分装密封保存。

2. 对于特定的细胞，LpoUp 作用浓度和作用时间可能有所不同，需自行摸索最佳工作浓度和作用时间，甚至某些细胞可能对 LpoUp 不敏感。

3. BODIPY 581/591 C11 的工作浓度、细胞量、孵育温度和时间等可根据所使用的细胞进行适当摸索和优化，例如 BODIPY 581/591 C11 的浓度可在 0.4μM~4μM（0.2×~2×）之间适当调整。

4. 为获得准确试验结果，建议样品在染色后 1 小时内进行分析。

5. 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。

6. 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。

7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

大连美仑生物技术有限公司
官网:https://www.meilunbio.com/
电话/邮箱:0411-62910999 sales@meilune.com
本产品仅供科研使用