

脂滴红色荧光检测试剂盒(LD540)

产品编号	产品名称	包装
C2050S	脂滴红色荧光检测试剂盒(LD540)	100-1000次
C2050M	脂滴红色荧光检测试剂盒(LD540)	500-5000次

产品简介:

- 碧云天的脂滴红色荧光检测试剂盒(LD540)，英文名为Lipid Droplet Red Fluorescence Assay Kit with LD540，也称LD540 Staining Kit或Red Neutral Lipid Stain，是一种基于新型高灵敏高精度荧光探针LD540来检测细胞内脂滴(Lipid droplets)的试剂盒。本试剂盒适用于荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测系统。
- 脂滴是由磷脂单分子层及甘油三酯(Triglyceride)、胆固醇酯(Cholesteryl ester, CE)组成的中性脂肪(Neutral lipid)疏水核心构成，广泛存在于动物、细菌、酵母、植物和昆虫细胞中[1]。脂滴能够沿着细胞骨架运动，并与其它细胞器相互作用，在脂类代谢与存储、膜转运、蛋白降解、以及信号传导过程中起着重要的作用。多种代谢性疾病，如肥胖、脂肪肝、心血管疾病及糖尿病、中性脂贮存性疾病和Niemann Pick C疾病等，可能都伴随着脂质贮存的异常[2]。
- 本试剂盒所使用的荧光探针为LD540 (4,4-Di-fluoro-2,3;5,6-bis-(tetra-methylene)-4-bora-3a,4a-di-aza-s-indacene)，LD540是一种基于BODIPY荧光基团修饰的新型高灵敏度亲脂性染料，适用于脂滴的精确标记和成像[3]。LD540具有良好的光稳定性和适宜的荧光光谱，可与多种常用荧光染料(如DAPI和Alexa Fluor 647等)兼容，支持多色成像的需求。此外，LD540同时适用于固定的细胞和活细胞，并能标记超小脂滴[3-5]。
- LD540的分子式为 $C_{18}H_{21}BF_2N_2$ ，分子量为314.18，CAS号为151486-58-7，其在乙醇中最大激发光波长约为537nm，最大发射光波长约为544nm。LD540的化学结构式和在水乙醇中的激发光和发射光光谱参考图1。

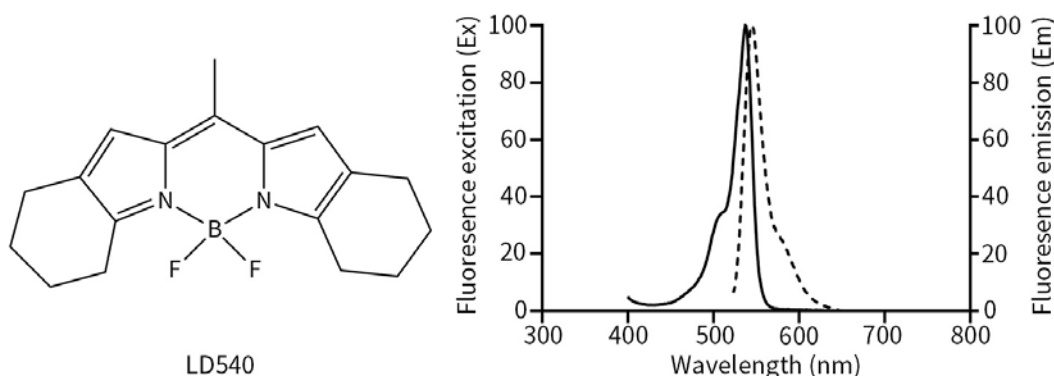


图1. LD540的化学结构和在无水乙醇中的激发光和发射光光谱。

- LD540在水和其它极性溶剂中几乎无任何荧光，一旦与甘油三酯等中性脂肪结合，便发出明亮的红色荧光。使用本试剂盒检测细胞内脂滴的效果请参考图2。

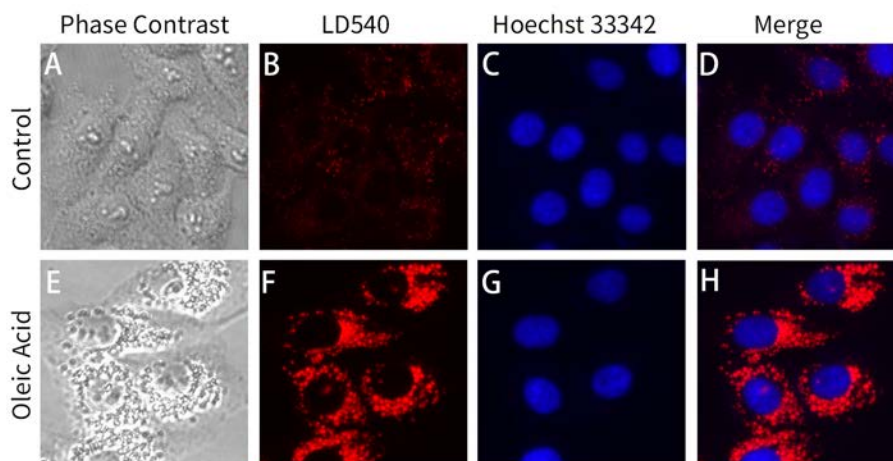


图 2. 碧云天脂滴红色荧光检测试剂盒(LD540) (C2050)检测 HeLa 细胞内脂滴的效果图。图 A 为正常 HeLa 细胞在显微镜明场下

的形态，正常细胞内无明显的脂滴聚集现象，因此经 LD540 (图 B)染色后呈较弱的荧光，主要为散在的微小脂滴染色；图 E 为使用 400 μ M 油酸(Oleic acid) (ST2053)诱导 24 小时后细胞在显微镜明场下形态，此时细胞内有很明显的脂滴聚集，脂滴经过 LD540 染色后，呈现非常明亮的荧光 (图 F)。图 C 和图 G 呈现了细胞核的染色效果，图 D、H 为 LD540 和 Hoechst 33342 荧光染色的叠加图。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异，本图仅供参考。

➤ 本试剂盒染色细胞后用于流式检测的效果请参考图3。

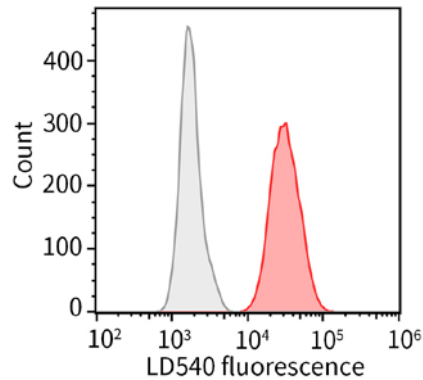


图3. 碧云天脂滴红色荧光检测试剂盒(LD540) (C2050)用于流式细胞仪检测的效果图。HeLa细胞经400 μ M油酸诱导24小时后，使用本试剂盒染色并进行流式检测。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异，本图仅供参考。

➤ 对于96孔板中的样品，按照每孔使用100 μ l染色液计算，本试剂盒小包装和中包装分别可以进行1000次和5000次检测；如果用于流式细胞仪检测，按照每个样品的检测体系体积为0.5ml时，本试剂盒小包装和中包装分别可以进行200次和1000次检测；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，本试剂盒小包装和中包装分别可以进行100次和500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C2050S-1	LD540 (1000X)	0.1ml
C2050S-2	Hoechst 33342 (1000X)	0.1ml
C2050S-3	Assay Buffer	100ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C2050M-1	LD540 (1000X)	0.5ml
C2050M-2	Hoechst 33342 (1000X)	0.5ml
C2050M-3	Assay Buffer	500ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存，至少一年有效。LD540 (1000X)和Hoechst 33342 (1000X)须避光保存。

注意事项：

- 第一次使用时LD540 (1000X)建议适当分装，避免反复冻融。
- LD540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LD540的浓度对于活细胞染色可在0.5X-2X之间适当调整，对于固定细胞染色可在0.1X-0.5X之间适当调整。
- 鉴于 LD540 的发射光谱范围，为避免绿色和红色荧光通道产生光谱重叠引起信号串扰，建议使用窄带滤光片，显微镜滤光片的设置请参考文献[3]。此外，在多荧光染料检测中，建议采用顺序采集方式，先采集绿色通道（如 GFP）信号，再采集红色通道（如 LD540）信号，从而有效减少通道间的信号重叠。
- 对于LD540的荧光检测，请注意设置好适当的阴性对照，特别是 不同荧光通道的阴性对照，以避免出现假阳性的干扰。
- LD540在激光照射下很容易发生淬灭，因此需要在保证荧光亮度的前提下尽可能降低染料使用浓度，降低荧光显微镜激发光强度，缩短拍照时间。
- 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。
- 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。
- 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. 染色液的配制。

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染色液，并充分混匀。

Reagent	1 Sample	10 Samples	100 Samples
LD540 (1000X)	1μl	10μl	100μl
Hoechst 33342 (1000X)	1μl	10μl	100μl
Assay Buffer	998μl	9.98ml	99.8ml
Staining Solution	1ml	10ml	100ml

注：配制好的Staining Solution必须一次使用完毕，不建议冻存或4℃保存后继续使用。染色液中LD540的浓度对于活细胞染色可以根据染色效果在0.5X-2X之间适当调整，对于固定细胞染色可以根据染色效果在0.1X-0.5X之间适当调整。

2. 荧光显微镜检测。

a. 接种培养。将细胞接种于6孔板等多孔板、细胞培养皿或者细胞爬片上。如有必要，按实验设计对细胞进行一定处理。

b. 固定(选做)。

(a) 取出待检测的细胞，使用PBS洗涤两遍，吸除PBS。

(b) 加入4%多聚甲醛固定液(P0099)室温固定10-15分钟。

注1：LD540和Hoechst 33342都适用于活细胞染色，也适用于固定后细胞的染色[3]。

注2：由于醇类能够溶解脂质，因此请使用醛类固定液进行固定。

注3：如果需要进行免疫染色而进行细胞通透，须避免使用含Triton X-100或Tween-20等去垢剂的通透液，而使用不会溶解细胞膜的去垢剂如含Saponin (P0095)或Digitonin (ST1272)的通透液，但仍然可能会一定程度的影响脂滴的形态。

c. 染色。

(a) 取出待检测的细胞，PBS洗涤1-2遍。

(b) 吸除PBS，加入适当体积的Staining Solution，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。室温下避光孵育10-20分钟。

(c) PBS洗涤两遍。

d. 检测。使用荧光显微镜观察时选择使用537nm左右激发，观察红色荧光。

注：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。

3. 流式细胞仪检测。

a. 细胞准备。

(a) 贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬，并用PBS洗涤一次；悬浮细胞250-1000×g室温离心5分钟，弃上清，用PBS洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为10⁶个细胞。

(b) 400×g室温离心5分钟，弃上清。

b. 固定(选做)。

(a) 加入4%多聚甲醛固定液(P0099)，轻轻吹打重悬为单细胞悬液，室温固定10-15分钟。

(b) 固定结束后，400×g室温离心5分钟，弃上清。

(c) 加入0.5ml PBS后缓慢用移液器吹打洗涤，然后400×g室温离心5分钟，弃上清。

注1：LD540和Hoechst 33342都适用于活细胞染色，也适用于固定后细胞的染色[3]。

注2：由于醇类能够溶解脂质，因此请使用醛类固定液进行固定。

注3：如果需要进行免疫染色而进行细胞通透，须避免使用含Triton X-100或Tween-20等去垢剂的通透液，而使用不会溶解细胞膜的去垢剂如含Saponin (P0095)或Digitonin (ST1272)的通透液，但仍然可能会一定程度的影响脂滴的形态。

c. 染色。

(a) 对于上一步骤的细胞沉淀，除背景对照管外，其余每管加入0.5ml Staining Solution，轻柔并充分重悬细胞，室温避光孵育10-15分钟。

(b) 400×g室温离心5分钟，弃上清。

(c) 每孔加入0.5ml PBS后缓慢用移液器吹打洗涤，然后400×g室温离心5分钟，弃上清。

(d) 每孔加入0.5ml PBS重悬细胞。

d. 检测。检测时参考其光谱特征选择合适的检测条件，例如Ex/Em=537/544nm。

注1：使用仅含Assay Buffer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2：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LD540的稀释倍数进行适当调整。

4. 荧光酶标仪检测。

a. 接种培养。将细胞接种于96孔板黑色多孔板中，如BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装) (FCP966)，每孔的细胞数需要控制在100-10,000个，通常宜在2000-5000个范围内。按实验设计对细胞进行一定处理。

b. 固定(选做)。

(a) 取出待检测的细胞，使用PBS洗涤两遍，吸除PBS。

(b) 加入4%多聚甲醛固定液(P0099)室温固定10-15分钟。

注1：LD540和Hoechst 33342都适用于活细胞染色，也适用于固定后细胞的染色[3]。

注2：由于醇类能够溶解脂质，因此请使用醛类固定液进行固定。

注3：如果需要进行免疫染色而进行细胞通透，须避免使用含Triton X-100或Tween-20等去垢剂的通透液，而使用不会溶解细胞膜的去垢剂如含Saponin (P0095)或Digitonin (ST1272)的通透液，但仍然可能会一定程度的影响脂滴的形态。

- c. 染色。
- (a) 取出待检测的细胞，使用PBS洗涤1-2遍。
- (b) 吸除PBS，加入适当体积的Staining Solution，通常96孔板每孔加入100μl。室温下避光孵育10-20分钟。
- (c) PBS洗涤两遍。
- d. 检测。参考其光谱特征，选取合适的波长进行读板，例如Ex/Em=537/544nm。具体根据酶标仪的特点选择，也不一定需要选用最大激发光/发射光波长来检测。
5. 阳性对照的诱导方法。油酸(ST2053)可以诱导培养细胞内脂滴生成，从而可以作为阳性对照。诱导培养细胞内形成脂滴的具体方法如下。
- a. 37°C条件下加热油酸，使其完全成为液体。
- b. 取63μl的油酸，加入到937μl的DMSO中，充分混匀，配制成200mM的油酸贮存液。贮存液可以保存在4°C，使用时37°C条件下加热混匀后即可使用。
- c. 细胞诱导前，配制含油酸的完全培养液。使用细胞的完全培养液按500:1稀释油酸贮存液，使油酸终浓度为400μM。
- 注：油酸具有一定的细胞毒性，因细胞而异，可以根据不同细胞状况调整油酸的使用终浓度。
- d. 待检测的细胞加入含油酸的完全培养液，37°C培养过夜。一般情况下，次日可以观察到囊泡状的脂滴。

参考文献：

1. Olzmann JA, Carvalho P. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019. 20(3):137-155.

2. Thiam AR, Farese RV Jr, Walther TC. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013. 14(12):775-86.

3. Spandl J, White DJ, Peychl J, Thiele C. Traffic. 2009.10(11):1579-84.

4. Salo VT, Li S, Vihinen H, Hölttä-Vuori M, Szkalisity A, et al. Dev Cell. 2019. 50(4):478-493.

5. Pfisterer SG, Gateva G, Horvath P, Pirhonen J, Salo VT, et al. Nat Commun. 2017. 8:14858.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0157	油红O染色试剂盒	50-250次/200-1000次
C0158	改良油红O染色试剂盒	50-250次/200-1000次
C2050	脂滴红色荧光检测试剂盒(LD540)	100-1000次/500-5000次
C2051	脂滴红色荧光检测试剂盒(Nile Red)	100-1000次/500-5000次
C2053	脂滴绿色荧光检测试剂盒(BODIPY 493/503)	100-1000次/500-5000次
C2055	BODIPY 500/510 C1, C12(脂肪酸绿色荧光探针)	1mg/5mg/25mg
C2056	脂肪酸摄取荧光染色试剂盒(BODIPY 500/510 C1, C12)	100-1000次/500-5000次
ST2053	油酸(≥99%, Cell Culture Grade)	100μl/500μl/2ml