



BODIPY 实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo	4131
电热恒温水浴锅	恩谊	HH-48

2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
6 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-6
脂质过氧化检测试剂盒	碧云天	S0043M
12 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-0296-4
Hoechst 33342	碧云天	C1022



二、BODIPY 实验步骤

1、BODIPY 581/591 C11 染色工作液的配制

6孔板每孔所需BDPY 581/591 C11 染色工作液的量为1ml,其它培养器皿的BODIPY 581/591 C11 染色工作液的用量以此类推；对于细胞悬液每50-100万细胞需0.5ml BODIPY 581/591 C11 染色工作液。取适量BODIPY 581/591 C11 (2mM)，按照每1 μ l BODIPY 581/591 C11 (2mM)加1ml PBS (C0221A)的比例稀释BDPY 581/591 C11，混匀后即为BODIPY 581/591 C11 染色工作液(2 μ M)。

注1：配制BODIPY 581/591 C11 染色工作液时注意避光，且须现配现用，不宜保存后使用。

注2：BODIPY 581/591 C11 染色工作液中BODIPY 581/591 C11 的最终浓度需根据不同细胞系和实验体系通过预实验进行优化。BODIPY 581/591 C11 的推荐工作浓度为2 μ M，可以在2-10 μ M 范围内摸索最佳工作浓度。

2、阳性对照的设置

把试剂盒中提供的LpoUp (1000X)推荐按照1:1000的比例加入到细胞培养液中，处理细胞4小时。随后按照步骤3加入BODIPY 581/591 C11 染色工作液，进行细胞内脂质过氧化产物的检测。对于大多数细胞，通常LpoUp (1X)处理4小时后脂质过氧化产物含量大量增加，BODIPY 581/591 C11 染色后观察应呈较强的绿色荧光，红色荧光减弱；而正常的细胞经BODIPY 581/591 C11 染色后应显示较强的红色荧光，绿色荧光较弱。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作用时间，甚至某些细胞可能对LpoUp不敏感。

3、对于悬浮细胞。

- a.细胞按照实验设计进行一定处理后，计数。取适当细胞600 \times g 室温离心5分钟，弃上清，加入适当体积的BODIPY 581/591 C11 染色工作液重悬细胞，使细胞密度为100-1000万/ml。
- b.细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C 孵育10-30分钟，不同的细胞最佳孵育时间不同。以20分钟作为初始孵育时间，根据作用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。
- c.37 $^{\circ}$ C 孵育结束后，600 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心3-4分钟，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。
- d.用PBS洗涤2次：加入1ml PBS 重悬细胞，600 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心3-4分钟，沉淀细胞，弃上清。再加入1ml PBS 重悬细胞，600 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心3-4分钟，沉淀细胞，弃上清。
- e.再用适量PBS 重悬细胞后，用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察，也可以用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

4.对于贴壁细胞

注：对于贴壁细胞，如果希望采用流式细胞仪检测，可以先消化并收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

- a.对于6孔板的一个孔，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。如果使用其它的多孔板，各种试剂的用量需要相应按比例调整。
- b.加入1ml BODIPY 581/591 C11 染色工作液。细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C 孵育10-30分钟，不同的



细胞最佳孵育时间不同。以 10 分钟作为初始孵育时间，根据作用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

c.37°C 孵育结束后，吸除上清，用 PBS 洗涤 2 次。

d.加入 2ml PBS，荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。如果考虑使用荧光酶标仪检测，优先推荐使用碧云天的 BeyoGold™全黑 96 孔细胞培养板(平底带盖，独立包装) (FCP966)或 BeyoGold™黑色透明底 96 孔细胞培养板(平底带盖，独立包装) (FCP965)，分别进行顶读或底读模式进行荧光检测。

5、参数设置

BODIPY 581/591 C11 的还原态产物最大激发和发射波长为 581/591nm，荧光参数设置参考碘化丙啶或 Cy3；经脂质过氧化氢物氧化后，激发和发射波长最大值偏移至约 488/510nm，荧光参数设置参考 GFP 或 FITC。还原态时主要为红色荧光，此时红绿荧光比值较大，氧化态主要为绿色荧光，此时红绿荧光比值降低，可通过红绿荧光的比值确定脂质氧化的程度。

三、结果判读：

BODIPY 581/591 C11 结果主要看红绿荧光转换，用于判断脂质过氧化/脂质 ROS 水平。绿光越强，脂质 ROS 越高；红光越强，脂质过氧化越低。

四、注意事项：

- 1、细胞状态要好
- 2、铺板密度要合适
- 3、加入试剂时应注意避光。染色后尽量减少强光照射，拍照前也不要长时间放在显微镜光源下。