〒113-0033
東京都文京区本郷 2-9-7
フナコシ株式会社

LipiORDER® <Membrane Lipid Order Imaging Dye>

商品コード FDV-0041

※本製品は研究用です。研究用以外には使用できません。

製品背景

脂質膜相状態（Membrane lipid order）は脂質膜の微小環境を表す生物物理学的パラメーターで、脂質のパッキング度合いとして表現されます。例えば、飽和脂肪酸のみで構成されるリン脂質は密度の高く厚みのある強固にパッキングされた脂質膜構造を形成し、秩序相（liquid-order phase; Lo）と呼ばれます。一方で、不飽和脂肪酸を含むリン脂質はその曲がった炭化水素構造により密度が低く薄い疎らなパッキング構造を形成し、無秩序相（liquid-disorder; Ld）と呼ばれます。飽和脂肪酸含有脂質と不飽和脂肪酸含有脂質を混在させた単純な脂質膜モデルでは Lo と Ld は明確に分離し、個々の脂質膜ドメイン構造を形成することが知られています。単純脂質膜モデルでは相状態は簡単に議論できますが、実際の細胞内では多種多様な脂質が含まれるため、細胞を構成する各種膜構造の相状態は非常に複雑になると考えられます。さらに相状態は構成脂質の構造以外にもコレステロールや膜タンパク質の存在などさまざまな要因に影響を受けることが知られています。脂質ラフト（Lipid raft）は細胞の代表的な脂質膜の Lo 構造で、コレステロールや膜タンパク質が濃縮した脂質膜の機能性ドメインとして細胞の機能発現との関係性が盛んに議論されています。脂質膜相状態は細胞の各種膜の物理学的性質を決める基本的な要素であると考えられ、膜の流動性、膜圧や膜曲率につながると考えられています。そのため、細胞における各種膜構造の脂質膜相状態を観察することは膜の機能を理解することにつながると期待されています。

脂質膜相状態の測定には Nile Red や Laurdan などの環境応答性蛍光色素が利用されてきました。環境応答性色素（solvatochromic dye）は周囲の溶媒環境に応じて蛍光波長や蛍光強度に変化する蛍光色素の総称で、これら環境応答性色素は脂質膜の相状態に応じて蛍光特性が変化することで相状態を定量的に測定することができます。中でも Laurdan は最も汎用される脂質膜相状態のイメージング解析用色素ですが、Laurdan は励起光として UV 光源が必要で、光安定性にも乏しいことから生細胞イメージングには不十分とされてきました。生細胞における脂質膜相状態のイメージング解析には、より長波長光源で励起可能で、かつ光安定性に優れた色素が期待されています。LipiORDER®は高知大学仁子陽輔博士、Strasbourg 大学 Andrey S. Klymchenko 博士らにより開発された新規環境応答性色素（原著論文での化合物名 PK）です。LipiORDER® は 405 nm レーザーで励起可能で、脂質膜の相状態に応じて緑色～赤色まで変化する特長があります。また、LipiORDER は光安定性および細胞中での化学的安定性に優れた特長があり、生細胞イメージングに向きます。このように LipiORDER は生細胞における脂質膜相状態イメージングに優れたツールとして利用できます。

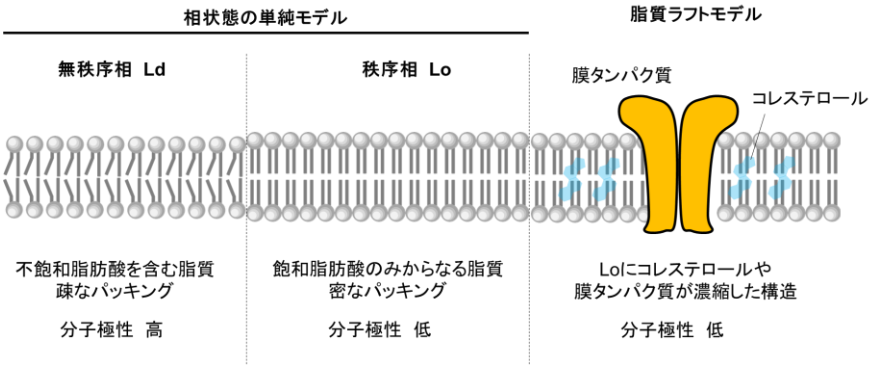


図 1 脂質膜相状態の概観図

原理と参考データ

LipiORDER®をもちいた脂質膜相状態の測定は LipiORDER®の 2 つのユニークな特長からなります。1) LipiORDER®はピレン骨格利用した環境応答性蛍光色素で、溶媒環境で大きな蛍光特性変化が観察されます。例えば低極性溶媒であるトルエン中では LipiORDER®は緑色蛍光を示し、アセトニトリル、DMSO、メタノールなど高極性溶媒になるにつれて長波長シフトが誘導されオレンジ色～赤色蛍光を示すようになります。2) LipiORDER®は疎水性の高い化合物で、さまざまな生体膜構造に濃縮します。この 2 つの特長を併せ持つことで、LipiORDER®は脂質二重膜における局所的な環境（極性）の検知が可能です。一般的に Lo は密なパッキングで低い極性を示すのに対し、Ld は疎らなパッキングにより水分子が入り込みやすく極性が高くなることが知られています。脂質膜相状態が生み出す脂質二重膜の極性に応じて LipiORDER®は膜上で緑色（Lo）～赤色（Ld）に変化します。赤色と緑色の蛍光強度比 F_{Red}/F_{Green} は脂質膜相状態と相関があり、定量的な解析が可能です。

実際に Lo モデルとしてスフィンゴミエリン／コレステロール（SM/Chol）モデルリポソームでは LipiORDER®は緑色蛍光が観察され、一方で Ld モデルとして DOPC リポソームでは赤色蛍光を示します。また、その中間的な DOPC/Chol リポソームでは黄色～オレンジ色蛍光を示しています。各赤色と緑色の蛍光強度比（F_{575}/F_{510}）は SM/Chol（Lo）で小さく、DOPC（Ld）で高くなることがわかります。

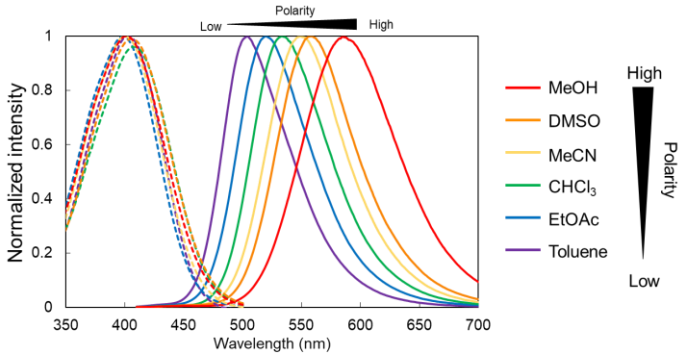


図 P1 さまざまな溶媒中における LipiORDER の吸収および蛍光スペクトル

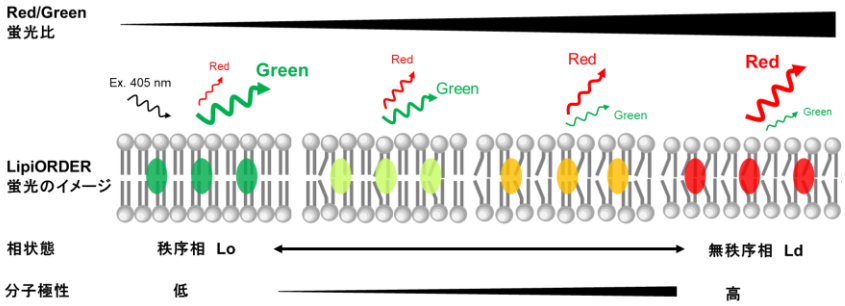


図 P2 脂質膜相状態依存的な LipiORDER の蛍光変化モデル

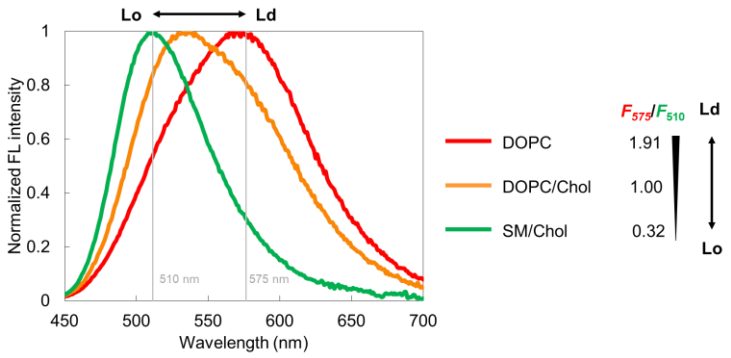


図 P3 リポソームモデルにおける LipiORDER の蛍光スペクトル

製品情報

商品コード: FDV-0041
包装サイズ: 0.1 mg
組成式: $C_{23}H_{21}NO$
分子量: 327.4 g/mol
溶解性: DMSO に可溶
蛍光特性: Ex. 405 nm/Em. 450-650 nm （溶媒に依存して変化）

溶解方法と保存方法

溶解方法: 1 mM/100% DMSO を推奨
保存温度（溶解前）: -20°C で保管
（溶解後）: DMSO 溶液として調製後は小分注して-20 °C で保管
凍結融解の繰り返しは避け、小分注品の使い切りを推奨

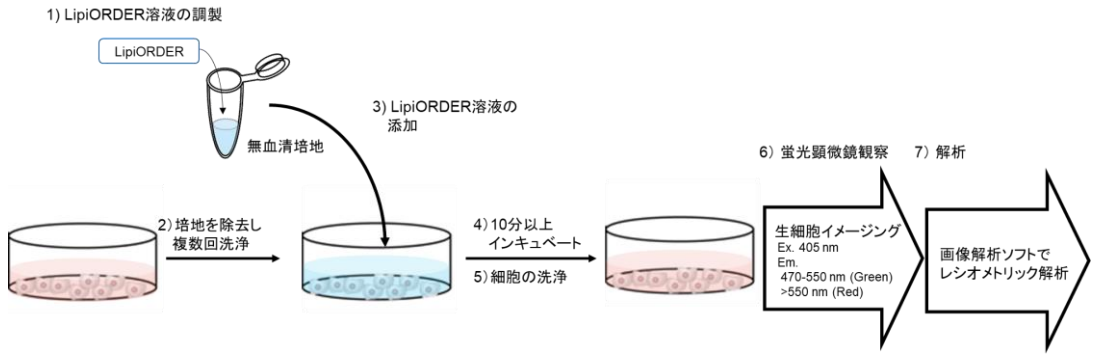
使用方法

生細胞イメージングのプロトコール例

*このプロトコールは培養細胞染色の一例です。ゼブラフィッシュの染色は参考文献 1 をご参照ください。

1. 0.1-1 μM LipiORDER®になるように HBSS などの無血清かつフェノールレッドフリー培地を用いて LipiORDER®溶液を調製
2. 培養細胞の培地を取り除き PBS で複数回細胞を洗浄
3. LipiORDER®溶液を細胞に添加
4. 細胞を 37℃で 10 分間以上インキュベート
5. 細胞を PBS または任意の培地で洗浄し、新しい培地を加える（オプション）
6. 生細胞条件下で共焦点レーザー顕微鏡により観察し、緑色蛍光および赤色蛍光画像を取得
7. 画像解析ソフトウェアにより緑色蛍光と赤色蛍光画像のレシオメトリック解析を実施

注 : LipiORDER®の最適な染色濃度は細胞や実験によって異なります。各実験で最適化することを推奨しています。



蛍光顕微鏡と解析

LipiORDER®をもちいたレシオメトリック解析では、共焦点レーザー顕微鏡の 405 nm レーザーを励起光源とし、緑色蛍光と赤色蛍光の 2 つのチャネルを検出します。推奨検出波長は緑色チャネルが 500-550 nm、赤色チャネルが 550-650 nm です。レシオメトリック解析（F_{Red}/F_{Green}）は ImageJ など任意の画像解析ソフトをご使用ください。

オプション : 下記溶液の画像を取得することで、レシオメトリック解析における各脂質膜相状態のキャリブレーションコントロールとして利用できます。

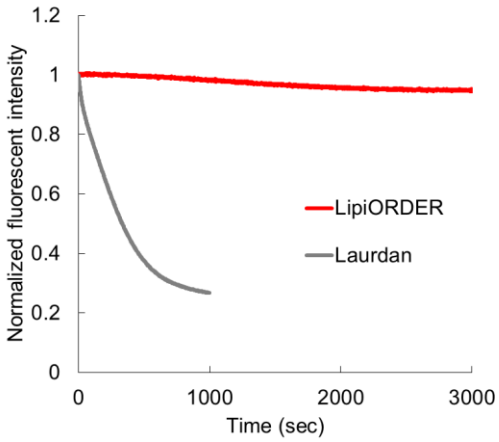
- Labrafac oil: 脂肪滴の模倣
- SM/Chol リポソーム: Lo モデル
- DOPC リポソーム: Ld モデル

注：Figure P1 に示すように、LipiORDER®は 480 nm 付近でほとんど吸収がありません。そのため LipiORDER は一般的な緑色蛍光色素（488 nm レーザー励起）や赤色蛍光色素（560 nm レーザー励起）と併用しマルチカラー染色が可能です。

アプリケーションデータ

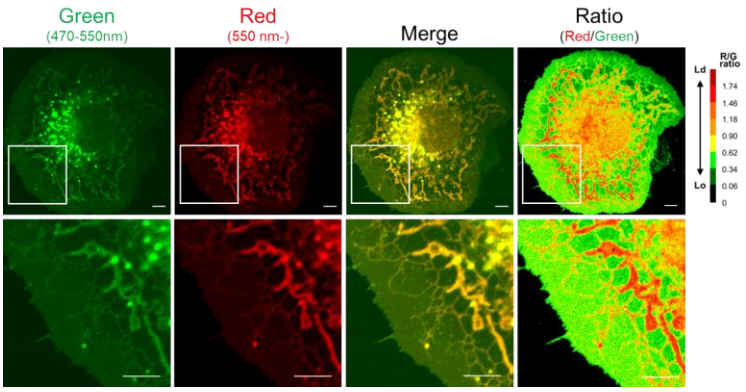
LipiORDER の光安定性

LipiORDER®および従来試薬 Laurdan により DOPC リポソーム／20 mM HEPES (pH 7.4) を染色後、Xe lamp を連続照射しながら各色素の蛍光強度を測定した。なお LipiORDER®は 405 nm、Laurdan は 360 nm を励起光として使用した。Laurdan は著しく光りにより分解し蛍光強度の減衰が観察されたが、LipiORDER®は少なくとも 1 時間ほとんど蛍光強度の変化が見られなかった。LipiORDER®は Laurdan に比べ高い光安定性を示すことがわかる。



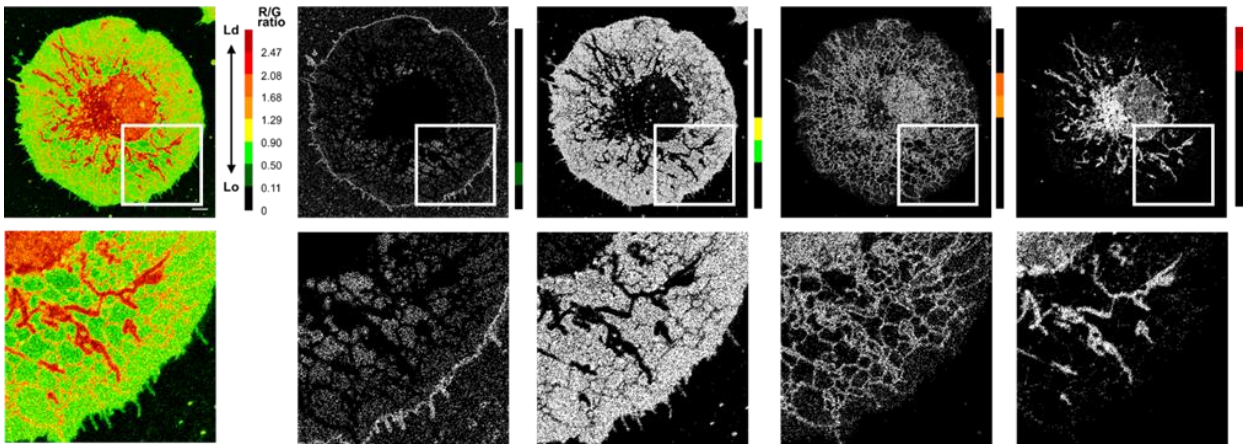
COS7 細胞のレシオメトリック解析

COS7 細胞を 300 nM LipiORDER®/HBSS 溶液で 10 分間染色後、共焦点レーザー顕微鏡（励起 405 nm、蛍光検出 470-550 nm（緑色チャネル）、>550 nm (赤色チャネル)で観察した。レシオメトリック解析は緑色チャネル画像と赤色チャネル画像データをもちいて ImageJ で実施し、蛍光比（赤色／緑色）を疑似カラー（**Lo**■■■■■■■**Ld**）でプロットした。細胞膜および細胞内膜はそれぞれ Lo、Ld を示していた。



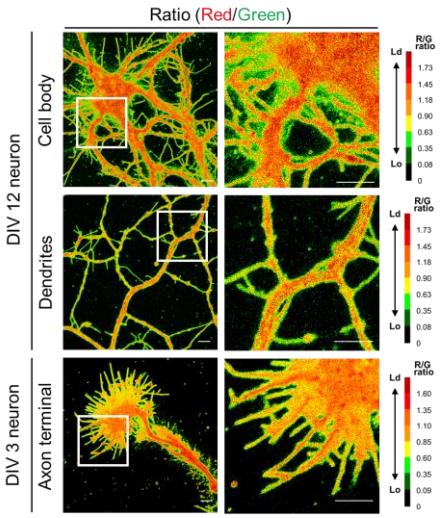
※膜相状態解析方法の例

レシオメトリック解析のヒートマップの各階層を抜き出し、それぞれ並べて示す。蛍光比が低い（Lo に近い）■では細胞膜構造が主に検出された。一方、蛍光比が高い（Ld に近い）■■は ER 様構造、■■はミトコンドリア様の構造が観察できた。

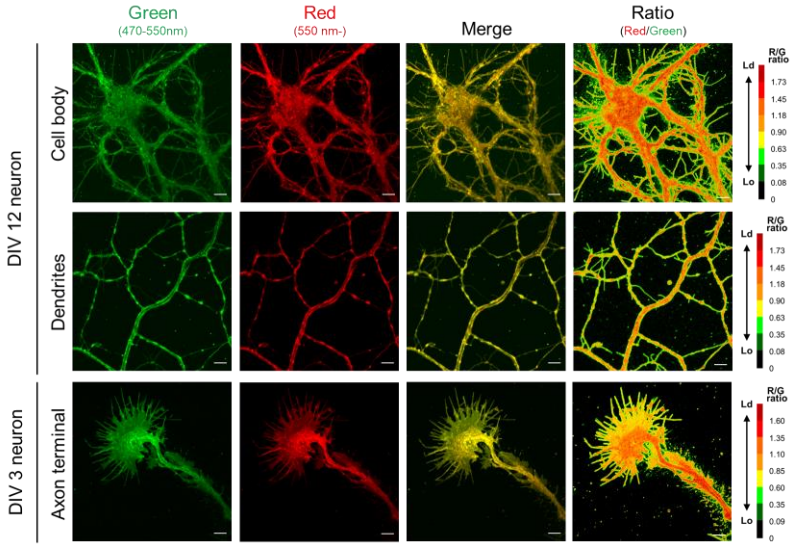


初代培養神経細胞のレシオメトリック解析

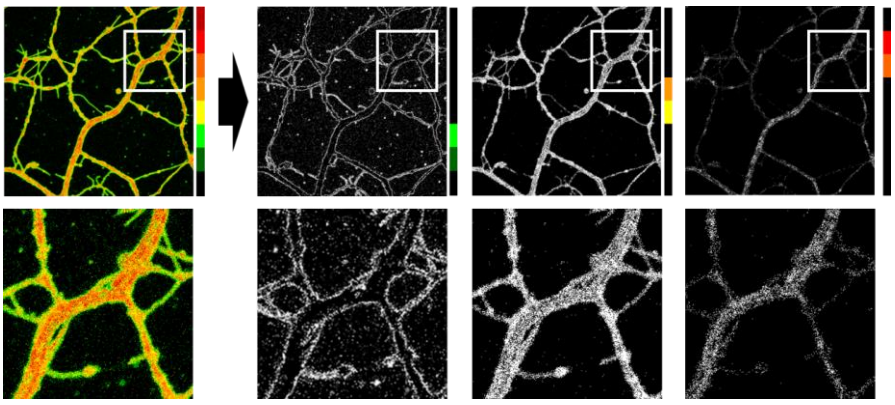
E17.5 マウスから取得した初代培養神経細胞（DIV3 または DIV12）を 300 nM LipiORDER®/HBSS 溶液で 10 分間処理し、共焦点レーザー顕微鏡（励起 405 nm、蛍光検出 470-550 nm（緑色チャネル）、>550 nm（赤色チャネル)で観察した。レシオメトリック解析は緑色チャネル画像と赤色チャネル画像データをもちいて ImageJ で実施し、蛍光比（赤色／緑色）を疑似カラー（**Lo** ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ **Ld**）でプロットした。



※各チャネルの蛍光画像と重ね合わせ画像。これらの画像データ基にレシオ解析を実施した。

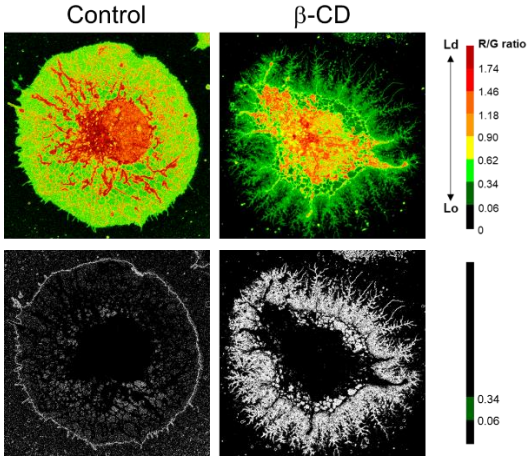


※DIV12 神経細胞の樹状突起の解析例。蛍光比の低い（Lo に近い）■ ■ は細胞膜構造を示した。一方で、中間的な蛍光比 ■ ■ および高蛍光比 ■ ■ は細胞内膜系から観察された。



薬剤処理による脂質膜相状態の変化の検出

COS7 細胞をコレステロール除去試薬である 15 mM β-cyclodextrin（β-CD）で 4 時間処理した後、300 nM LipiORDER®/HBSS 溶液で 10 分間処理し、共焦点レーザー顕微鏡（励起 405 nm、蛍光検出 470-550 nm（緑色チャネル）、>550 nm (赤色チャネル)で観察した。レシオメトリック解析は緑色チャネル画像と赤色チャネル画像データをもちいて ImageJ で実施し、蛍光比（赤色／緑色）を疑似カラー（**Lo**■■■■■■■**Ld**）でプロットした。β-CD 処理により細胞構造が大きく変化するとともに、蛍光比の低い■の分布が大きく変わっていた。



※本資料のスペクトルデータおよび光安定性データは高知大学　仁子陽輔博士より提供いただきました。

細胞イメージングデータは名古屋市立大学　服部光治博士より提供いただきました。

参考文献

1. Valanciunaite *et al., Anal. Chem.*, **92**, 6512-6520 (2020)　Polarity Mapping of Cells and Embryos by Improved Fluorescent Solvatochromic Pyrene Probe.

funakoshi
FRONTIERS IN LIFE SCIENCE
URL: http://funakoshi.co.jp
9-7 Hongo 2-Chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033

funakoshi
FRONTIERS IN LIFE SCIENCE

9-7 Hongo 2-Chome, Bunkyo-Ku
Tokyo 113-0033, Japan

LipiORDER <Membrane Lipid Order Imaging Dye>

Catalog NO. FDV-0041

Research use only, not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

日本語版はこちらから
ダウンロードできます。
①弊社ウェブサイトより
Webページ番号検索にて
【70873】で検索
②QRコードより

Product Background

Membrane lipid order is a biophysical parameter that defines a membrane organization and is often described by the degree of lipid packing. For example, phospholipids only containing saturated lipids create high packing and thick lipid bilayer, called liquid-order (Lo) phase. On the other hand, phospholipids containing unsaturated lipids, which have bent structure, form low packing and thin membrane structure, called liquid-disorder (Ld) phase. In the model membrane mixing saturated lipids and unsaturated lipids, Lo and Ld are clearly separated and create individual domains. While the model membrane composition can be discussed membrane lipid order (Lo/Ld) easily, actual cells have numerous types of lipids and form very complicated membrane lipid orders. Furthermore, the lipid order is also influenced by various factors in cellular membranes, including sterol lipids such as cholesterol and membrane proteins, etc. Lipid raft, a continuous interest topic in biology, which serves as functional microdomains on cellular membranes, is one of the specialized Lo domains, with highly accumulated saturated lipids such as sphingomyelin, cholesterol, functional membrane proteins and lipidated proteins. Membrane lipid order has been considered as a fundamental factor in providing physical properties of cellular membranes, such as membrane fluidity, membrane tension and membrane curvature. Observation of cellular lipid order may lead to an understanding of the various function of cellular membranes.

To measure membrane lipid order, some solvatochromic dyes which change fluorescence intensity and color in response to their solvent polarity are applied. These solvatochromic dye fluorescent properties change depending on membrane lipid order. Among them, Laurdan is the most well-known dye for membrane lipid order imaging. However, conventional dyes have some limitations. For example, Laurdan requires UV light excitation and exhibits low photostability. So Laurdan is not suitable for live-cell imaging. Dyes which can be excited by longer wavelength with more photostability and chemically stable in cells are desirable traits for cellular imaging of membrane lipid order. **LipiORDER** is a novel solvatochromic dye for membrane lipid order imaging originally developed by Dr. Yosuke Niko, Kochi University, and Dr. Andrey S. Klymchenko, University of Strasbourg (original compound name PK in Ref.1). LipiORDER is excited at around 400 nm wavelength, which is compatible with live-cell imaging and changes its emission fluorescent color from green to red depending on membrane lipid order. **LipiORDER** also has high photostability and chemical stability on the cell membranes. LipiORDER is a convincing tool to monitor cellular membrane lipid order imaging on live-cells.

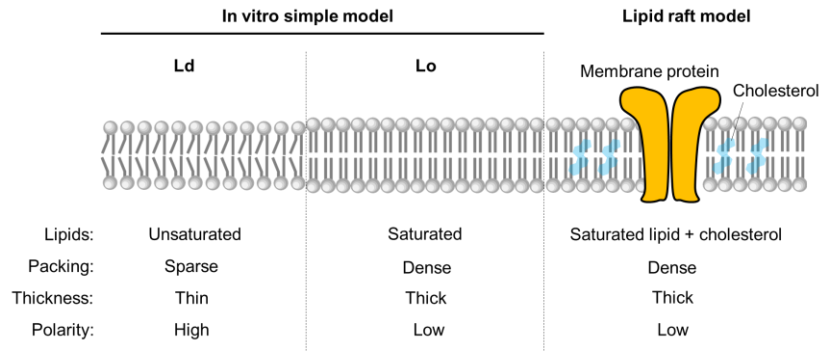


Figure 1. Overview of membrane lipid order

Principle and Reference data

Sensing of lipid order by using LipiORDER is based on the following two unique properties. 1) LipiORDER is a pyren-based solvatochromic fluorescent dye which changes fluorescent property in response to their solvent environment (Figure P1). In low polaric solvents such as toluene, LipiORDER shows green fluorescence. On the other hand, in highly polaric solvents such as DMSO and methanol, this dye changes color to orange or red. 2) LipiORDER is a highly hydrophobic compound and quickly accumulates in the various biological membranes. Combining the two features above, LipiORDER can sense the local environment in a lipid bilayer. Generally, Lo is a high packing lipid bilayer and shows lower polarity, whereas Ld is a sparse packing lipid bilayer and shows high polarity. Based on polarity of lipid bilayer derived from lipid order, LipiORDER will change fluorescent color, from green on Lo membrane to red on Ld membrane (Figure P2). Ratiometric fluorescent value (F_{Red}/F_{Green}) is correlated to lipid order (Lo and Ld).

Actually, in sphingomyeline/cholesterol (SM/Chol) liposome, one of the model Lo, LipiORDER emits green fluorescence and in 1,2-dioleoyl-sn-glucero-3-phosphocholine (DOPC) liposome, a model Ld, shows red fluorescence. In DOPC/Chol, an intermediate model, the reagent show yellow to orange. The ratiometric values (F_{575}/F_{510}) clearly depend on lipid order, SM/Chol (Lo) is low and DOPC (Ld) is high (Figure P3).

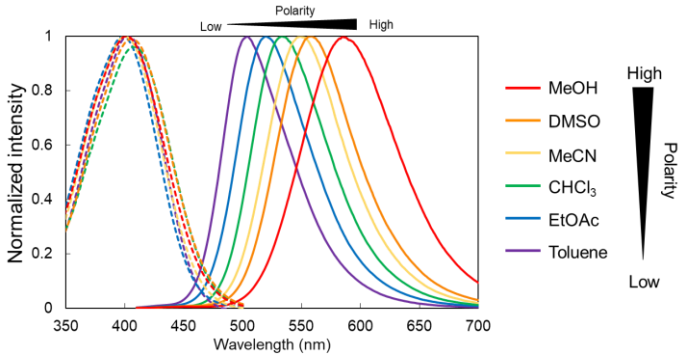


Figure P1　Absorption and fluorescent spectrum of LipiORDER in various solvent

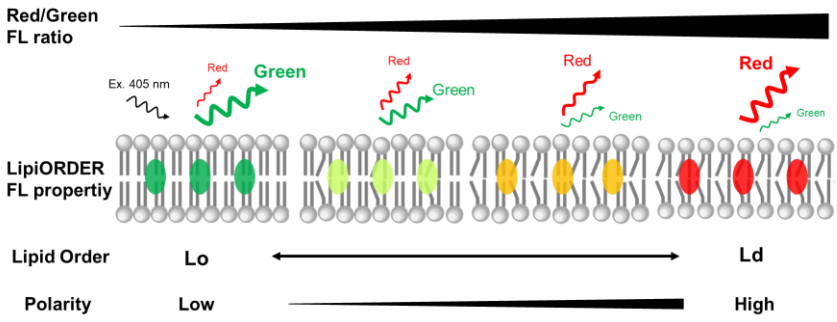


Figure P2　Graphical overview of lipid order-dependent fluorescent change of LipiORDER

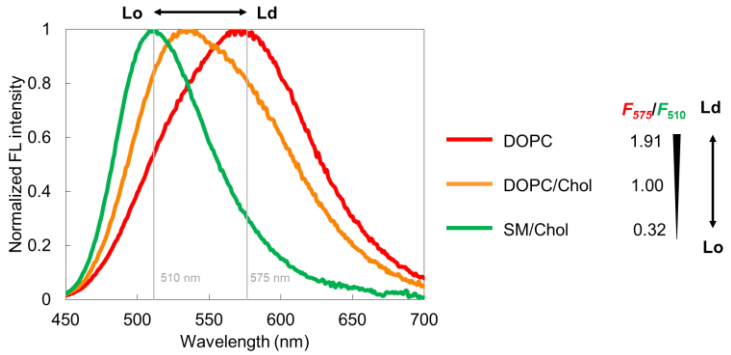


Figure P3　Fluorescent spectrum of LipiORDER in model liposomes

Description

Catalog Number: FDV-0041
Size: 0.1 mg
Formulation: $C_{23}H_{21}NO$
Molecular weight: 327.4 g/mol
Solubility: Soluble in DMSO
Fluorescent characteristics: Ex. 405 nm/Em. 450-650 nm (dependent on solvents)

Reconstitution and Storage

Reconstitution: Stock solution recommended concentration 1 mM in 100% DMSO.
Storage (powder): Store powder at -20°C.
Storage (solution): After reconstitution in DMSO, aliquot and store at -20 °C.
Avoid repeated freeze-thaw cycles.

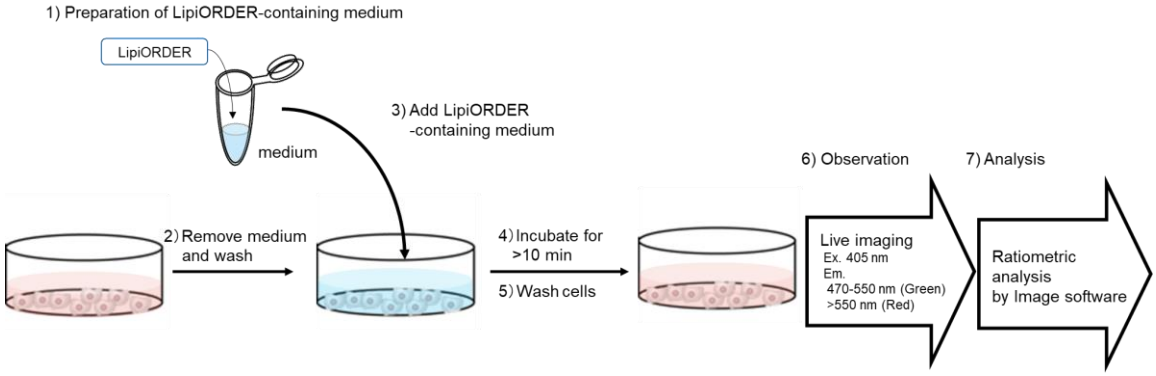
How to use and experimental setting

General procedure of live cell imaging

*This procedure is an example of cultured cell staining. For zebrafish staining, please find Ref.1.

1. Prepare 0.1-1 μM LipiORDER in serum-free and phenol red-free medium such as HBSS
2. Remove culture medium and wash cells PBS several times
3. Add LipiOREDR-containing medium to cells
4. Incubate cells at 37 °C for over 10 min
5. Wash cells with PBS or medium (Optional)
6. Observe cells under live condition with confocal laser microscopy and obtain green and red fluorescent images
7. Perform ratiometric analysis with image software using green and red fluorescent images

NOTE: The staining concentration of LipiORDER is dependent on cell type and experiments. Please empirically optimize to determine the suitable concentration for each experiment.



Fluorescent microscopy and analysis

For LipiORDER ratiometric imaging, LipiORDER is exited at 405 nm and its fluorescence is detected with two ranges, green channel and red channel. The recommended wavelength range of green channel and red channel is 500-550 nm and 550-650 nm, respectively. Ratiometric image analysis (F_{Red}/F_{Green}) is calculated by any image processing software such as ImageJ.

Option: For calibration control of each model lipid order, we recommend obtaining the following images.

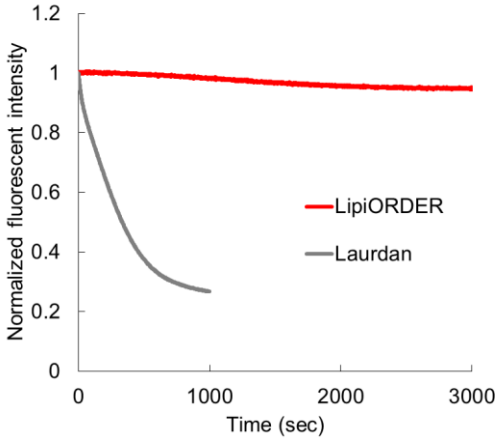
- Labrafac oil for lipid droplet,
- SM/Chol liposome for Lo model
- DOPC liposome for Ld model

NOTE: As you can see in Figure P1, the absorbance of LipiORDER at around 480 nm is negligible. LipiORDER is compatible with common green dyes (excited by ~480 nm laser) and red dyes (excited by ~560 nm) for multicolor staining.

Application data

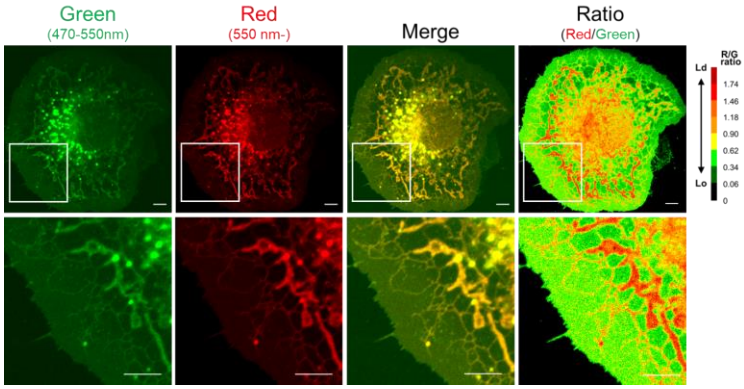
Photostability of LipiORDER

LipiORDER and Laurdan, a conventional membrane lipid order imaging dye in lipid vesicles composed of 0.2 mM DOPC in 20 mM HEPES (pH 7.4) were irradiated with Xe lamp. LipiORDER and Laurdan were excited at 405 nm and 360 nm, respectively and fluorescent intensity was measured. Laurdan was quickly photodegraded, whereas LipiORDER maintains fluorescent intensity for at least 1 hour. LipiORDER is highly stable compared to Laurdan.



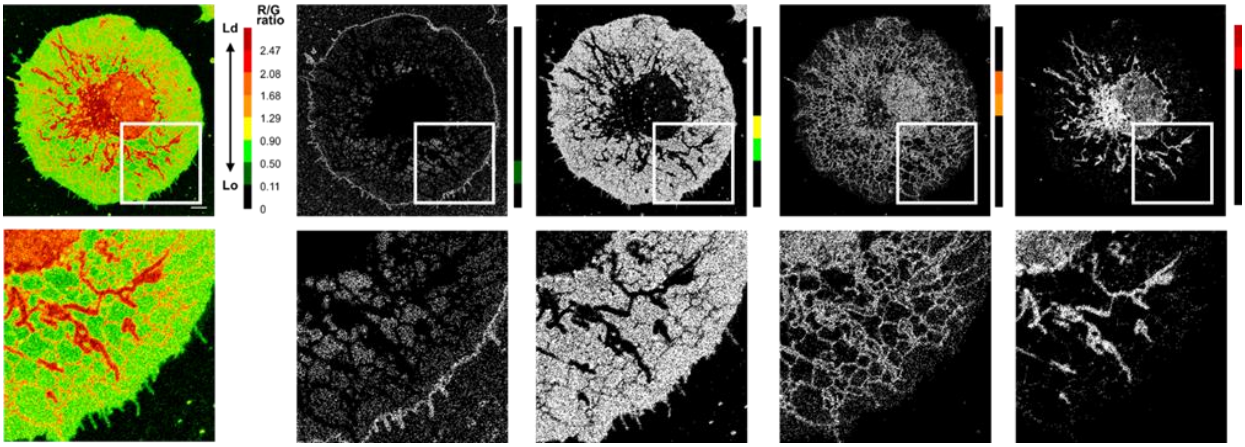
Ratiometric imaging of COS7 cells

COS7 cells were treated with 300 nM LipiORDER in HBSS for 10 min and observed by confocal laser microscopy (Ex. 405 nm, Em 470-550 nm for Green channel and >550 nm for Red channel). Ratiometric analysis was performed with ImageJ using green and red channel data and lipid order was shown by green-to-red pseudocolor (**Lo** ■■■■■■■■ **Ld**). Plasma membrane and intramembranes are shown Lo and Ld, respectively.



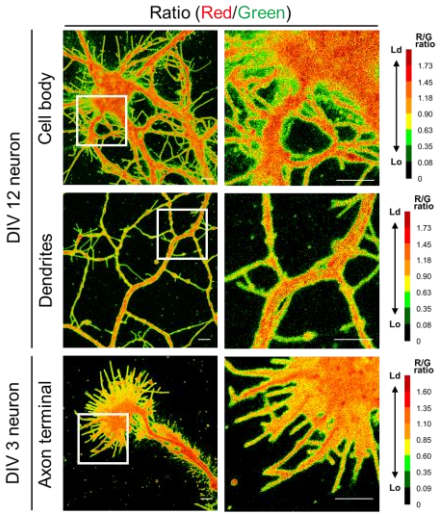
*An example of membrane lipid order analysis

Each layer of ratiometric pseudocolor was extracted. Low ratio value ■ shows plasma membrane structure mainly and high ratio value ■■ and ■■ mainly shows how ER-like and mitochondria-like structure, respectively.

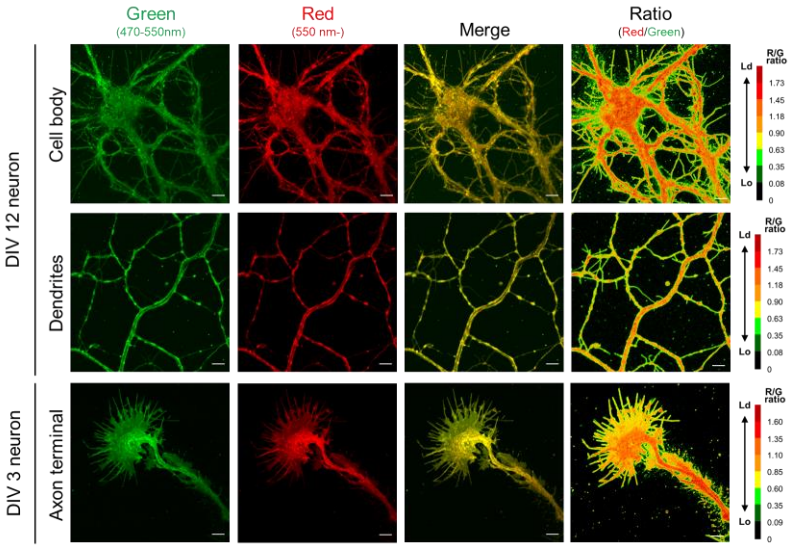


Ratiometric imaging of neuronal cells

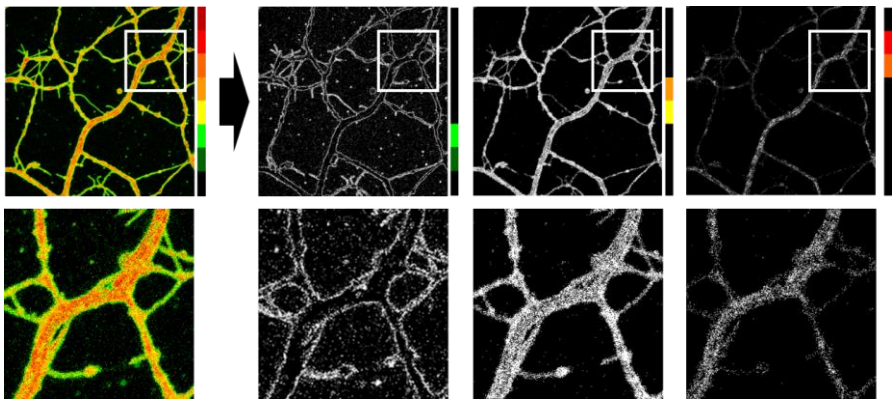
Primary cultured hippocampal neurons (DIV 3 or DIV 12) from E17.5 mice were stained with 300 nM LipiORDER in HBSS for 10 min and observed by confocal laser microscopy (Ex. 405 nm, Em. 470-550 nm for Green channel and >550 nm for Red channel). Ratiometric analysis was performed with ImageJ using green and red channel data and lipid order was shown by green-to-red pseudocolor (**Lo** ■■■■■■■ **Ld**).



* Each fluorescent imaging data is shown below. The ratiometric data was calculated using the following pictures.

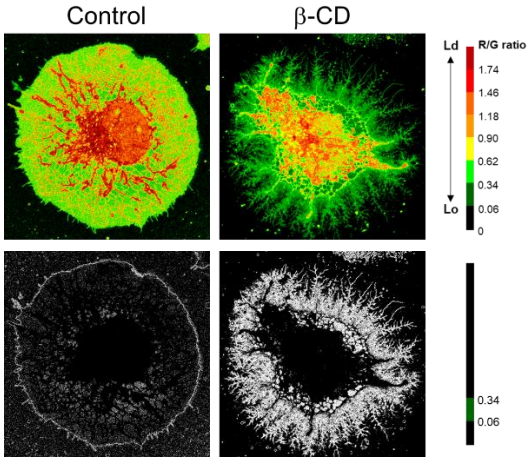


*An example of membrane lipid order analysis (Dendrites in DIV12 neurons). Near Lo phases (■■) clearly shows plasma membrane structures. On the other hand, intermediate (■■) and Ld phases (■■) were observed from intracellular compartments.



Drug-induced cellular lipid order changes

COS7 cells were treated with 15 mM β-cyclodextrin (β-CD), a membrane-disrupting chemical via removing endogenous cholesterol, for 4 hours. After β-CD treatment, cells were washed and stained with 300 nM LipiORDER in HBSS for 10 min. The cells were observed by confocal laser microscopy (Ex. 405 nm, Em. 470-550 nm for Green channel and >550 nm for Red channel). Ratiometric analysis was performed with ImageJ using green and red channel data and lipid order is shown by green-to-red pseudocolor (**Lo** ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ **Ld**). The cell structure was dramatically changed by β-CD and at the same time, the distribution of Lo phase (■) clearly changed.



Notes

All spectrum data and a photostability data were obtained by Dr. Yosuke Niko, Kochi University.

All cell imaging data were obtained by Dr. Mitsuharu Hattori, Nagoya City University.

Reference

1. Valanciunaite *et al., Anal. Chem.*, **92**, 6512-6520 (2020) Polarity Mapping of Cells and Embryos by Improved Fluorescent Solvatochromic Pyrene Probe.

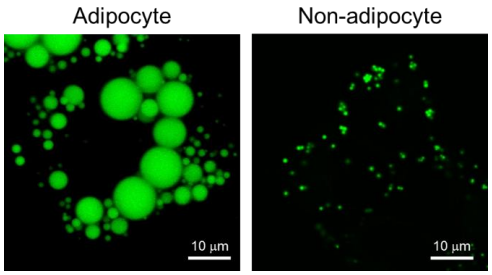
Related products

LipiDye II <Live Imaging>

LipiDye II is a highly sensitive lipid droplet staining dye with extremely photostable property. This dye is the second generation of our previous reagent, LipiDye. This dye allows us to detect small lipid droplets (<1 μm) in non-adipocytes and to apply into long-term live cell imaging for dynamic lipid droplet movements.

Catalog No. FDV-0027
Size 0.1 mg
Features

- Recommended Ex/Em:400-500 nm / 490-550 nm
- Enable to detect <1 μm lipid droplets
- Suitable for long-term live cell imaging
- Extremely photostable compared with conventional dyes
- Compatible with both live and fixed cells

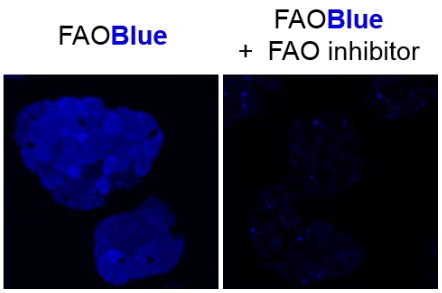


FAOBlue <Fatty Acid Oxidation Detection Reagent>

FAOBlue is a cell-based fatty acid beta-oxidation (FAO) detection dye which emits blue fluorescence upon FAO activity. FAOBlue enables to quantitatively monitor cellular FAO activities under various conditions.

Catalog No. FDV-0033
Size 0.2 mg
Features

- Recommended Ex/Em:~405 nm / 460 nm
- Enable to detect cellular FAO activity directly without any specific equipment, only need microscopy.
- Monitor drug-induced change of FAO activity quantitatively.

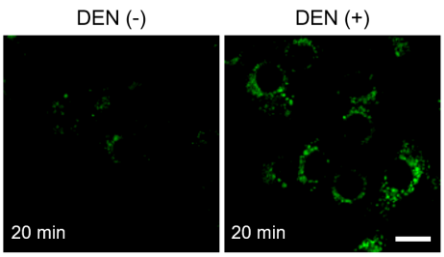


LipiRADICAL Green <Lipid Radical Detection Reagent>

LipiRADICAL Green is a specific fluorescent dye for lipid-derived radicals which are the most upstream factor of lipid peroxidation (LPO). LipiRADICAL Green can be applied into both *in vitro* assay and cell-based assay to monitor lipid radical productions.

Catalog No. FDV-0042
Size 0.1 mg
Features

- Recommended Ex/Em:~480 nm / 520 nm
- Enable to detect very unstable lipid-derived radicals
- Compatible with *in vitro* assay and in cell-based assay
- An innovative reagent for comprehensive identification of lipid-derived radicals by lipidomics



funakoshi
FRONTIERS IN LIFE SCIENCE
URL: http://funakoshi.co.jp
9-7 Hongo 2-Chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033