

## Beyo3D™线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1411S	Beyo3D™线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1411M	Beyo3D™线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	50次

### 产品简介:

- 碧云天的Beyo3D™线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒(Beyo3D™ Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis Detection Kit with Mito-Tracker Red CMXRos and Annexin V-FITC), 是一种联合使用线粒体膜电位依赖性的红色荧光探针 Mito-Tracker Red CMXRos (也称MitoTracker Red CMXRos)和细胞凋亡绿色荧光探针Annexin V-FITC来检测细胞球或类器官线粒体膜电位和细胞凋亡的红绿荧光双染检测试剂盒。本试剂盒可快速、便捷地用于3D培养的细胞球或类器官线粒体膜电位变化的红色荧光染色和凋亡细胞细胞膜的绿色荧光染色, 同时试剂盒还提供了用于细胞核荧光染色的Hoechst 33342染色液, 便于在有需要的时候同时通过细胞核的碎裂和致密浓染等从形态学上观察细胞凋亡。仅需染色15分钟, 就可在荧光显微镜下观察到非常明亮的凋亡细胞和正常细胞线粒体膜电位红色荧光差异和凋亡细胞中细胞膜绿色荧光染色。本试剂盒适用于荧光显微镜、荧光酶标仪及其它荧光检测系统。
- 本试剂盒使用便捷, 结果清晰。本产品同时检测线粒体膜电位变化和磷脂酰丝氨酸外翻两个重要的凋亡检测指标。本试剂盒检测后, 活细胞绿色荧光阴性, 但红色荧光阳性; 而凋亡细胞绿色荧光阳性, 同时红色荧光显著减弱或者呈现阴性, 活细胞和死细胞的红绿荧光对比非常鲜明(参见图1), 可以使用荧光显微镜、流式细胞仪或其它荧光检测设备进行检测。需要指出的是, 红色荧光染色在诱导凋亡或坏死后会逐渐减弱, 但部分红色荧光减弱的细胞不一定绿色荧光染色阳性。需要指出的是, 磷脂酰丝氨酸外翻是细胞凋亡的早期事件, 在凋亡早期不一定会出现细胞核碎裂或致密浓染等细胞凋亡时细胞核的形态学变化。
- 本试剂盒检测的是Mito-Tracker Red CMXRos的红色荧光和Annexin V-FITC的绿色荧光。同时本试剂盒提供Hoechst 33342, Hoechst 33342是一种具有细胞膜通透性的蓝色荧光染料, 对细胞的毒性较低, 是一种优秀的活细胞细胞核染料。
- **本试剂盒适用范围广。**本试剂盒可用于常规方法培养出的3D细胞球或类器官, 包括超低吸附细胞培养板、Matrix-Gel™基质胶或Matrigel包被的平板、琼脂糖包被的平板、细胞悬滴培养板等。
- **本试剂盒使用便捷, 整个检测过程仅需约15-30分钟即可完成。**3D细胞球经凋亡、坏死等诱导处理后, 将本试剂盒中的Beyo3D™ Annexin V-FITC (40X)、Beyo3D™ Mito-Tracker Red CMXRos (100X)和Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(100X)按照相应比例用Beyo3D™ Annexin V-FITC结合液配制成Beyo3D™ Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342检测工作液, 避光孵育15分钟, 就可进行后续的荧光显微镜拍照等荧光检测和分析。本产品对3D培养的HCT-116细胞的染色效果参考图1。

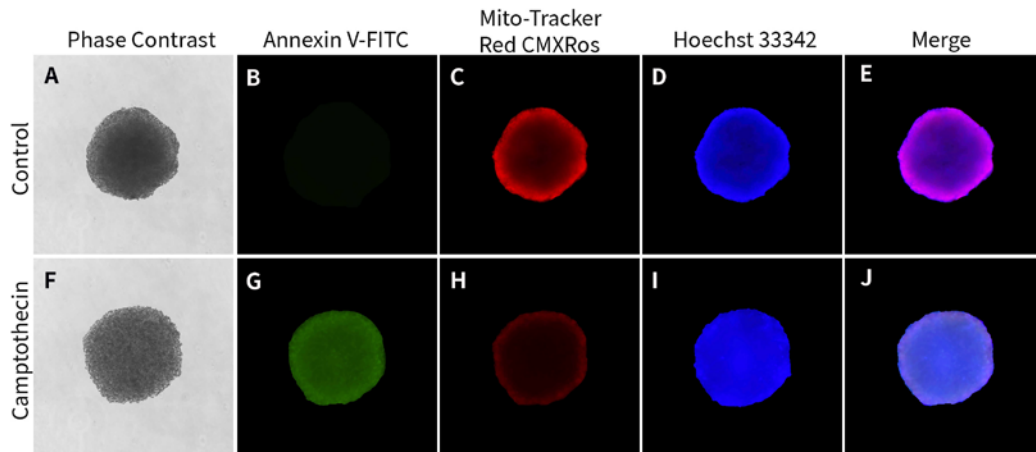


图1. 碧云天Beyo3D™线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒(C1411)对于3D培养的HCT-116细胞的染色效果图。5000个HCT-116细胞使用碧云天3D细胞培养包被试剂盒(U形底96孔板) (C0366)包被的U形底96孔板培养48小时, 100μM Camptothecin (Topoisomerase抑制剂) (SC0141)诱导细胞球凋亡、坏死过夜, 然后吸除培养液后直接加入1X的Beyo3D™ Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342检测工作液, 染色15分钟。结果显示, Beyo3D™线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒对于药物诱导凋亡、坏死后的3D细胞染色效果清晰、明亮, Annexin V-FITC染色的凋亡或坏死细胞膜(B、G)和Mito-Tracker Red CMXRos染色的正常细胞和凋亡细胞的线粒体膜电位(C、H)可见明显差别, Hoechst 33342染色的细胞核总

体基本一致，诱导凋亡后染色略更明亮一些(D、I)。实际检测效果会因细胞株、实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- 细胞凋亡(Apoptosis)是生物体发育等生命过程中普遍存在的、由基因决定的细胞主动有序的死亡方式。当细胞遇到内、外环境因子刺激时，启动基因调控的自杀保护措施，去除体内非必需细胞或即将发生特化的细胞。在这一过程中，细胞脱落离体或裂解为若干凋亡小体，并迅速被巨噬细胞或邻近细胞清除，这是一种由基因控制、高度有序的细胞自主死亡，包含一系列信号事件组成的通路。细胞凋亡失调与多种疾病有关，例如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)和癌症等。
- 细胞凋亡通过特征性的形态学和生物化学变化而区别于坏死(Necrosis)，包括细胞皱缩、细胞核皱缩、核膜核仁破碎等等。在正常活细胞中，磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, 简称PS)位于细胞膜的近细胞质面。而在凋亡细胞中，PS从质膜的内部外翻到细胞表面即细胞膜外侧，从而使PS暴露于细胞外部。在白细胞的凋亡过程中，白细胞表面的PS标记可以被巨噬细胞识别，从而最终被巨噬细胞吞噬。人血管抗凝血剂Annexin V是一种35-36kDa  $Ca^{2+}$ 依赖性磷脂结合蛋白，对PS具有高亲和力。用带有绿色荧光的FITC标记的Annexin V (Annexin V-FITC)染色细胞，就可以通过荧光显微镜、激光共聚焦显微镜或流式细胞仪等荧光检测设备非常简单而直接地检测到磷脂酰丝氨酸的外翻这一细胞凋亡的重要特征。需要指出的是对于坏死细胞，由于细胞膜的完整性被破坏，位于细胞膜内侧的PS也会被Annexin V-FITC染色。
- Mito-Tracker Red CMXRos (线粒体红色荧光探针)是一种具有细胞通透性的X-rosamine衍生物(Chloromethyl-X-rosamine, 简称CMXRos)，能够特异性地标记细胞中具有生物活性的线粒体。对于正常细胞，Mito-Tracker Red CMXRos可以把其中的线粒体染色为明亮的红色荧光，而当细胞发生凋亡等时，线粒体膜电位下降，此时线粒体的红色荧光会逐渐减弱，甚至呈现红色荧光阴性。
- 传统的细胞培养大多以二维(Two-dimensional, 2D)的形式展开，但2D培养的细胞在生长方式、生长形态、分化和功能等方面都与体内生理条件下细胞的真实形态和结构存在明显差异，可能会因为细胞结构和组织形态的缺失，使实验结果的可信度降低[1-3]。三维(Three-dimensional, 3D)细胞培养能够更好地模拟体内细胞生存的微环境，更能代表体内组织，也能更真实地反映细胞与细胞间、细胞与基质间的相互作用，细胞对外源性和内源性刺激的应答也更接近于它们在体内的反应，3D细胞培养从而成为更有价值并更为可信的体外实验模型，能够获得与体内实验更加一致的实验结果[4-5]。
- 3D肿瘤细胞模型越来越多地被用于了解疾病机制和药物研发。2D培养的肿瘤细胞，其单侧细胞膜可以均匀地获得营养和氧气，而3D培养的肿瘤细胞团的内部细胞获得营养和氧气的机会更少，形成自然的营养和氧气梯度，能更好地模拟体内微环境条件，因此3D培养的肿瘤球状体(Spheroid)或肿瘤类器官(Organoid)等能更好地模拟体内肿瘤，更利于小分子药物筛选或者肿瘤相关分子机制的研究，也更能准确地预测药物治疗的体内反应、疗效或毒性。同时，2D肿瘤细胞模型体外扩增有一定局限性，在传代后容易丧失原肿瘤的遗传异质性，出现优势克隆选择性，从而降低临床相关性。相比于2D细胞模型，3D细胞球或者类器官很多情况下能提供更可信的研究结果，简化并加速药物评价流程。自2009年小肠类器官首次建立至今，3D细胞和类器官研究已经扩展到很多组织系统，并成为生命科学最热门的领域之一。
- 按照96孔板每孔需要100 $\mu$ l Beyo3D™ Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342检测工作液，本试剂盒小包装可以进行20个样品的检测，中包装可以进行50个样品的检测。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C1411S-1	Beyo3D™ Mito-Tracker Red CMXRos (100X)	20 $\mu$ l
C1411S-2	Beyo3D™ Annexin V-FITC (40X)	50 $\mu$ l
C1411S-3	Beyo3D™ Annexin V-FITC结合液	2ml
C1411S-4	Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(100X)	20 $\mu$ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1411M-1	Beyo3D™ Mito-Tracker Red CMXRos (100X)	50 $\mu$ l
C1411M-2	Beyo3D™ Annexin V-FITC (40X)	125 $\mu$ l
C1411M-3	Beyo3D™ Annexin V-FITC结合液	5ml
C1411M-4	Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(100X)	50 $\mu$ l
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。除Beyo3D™ Annexin V-FITC结合液外，都须避光保存。

#### 注意事项：

- 尽管经测试Beyo3D™ Annexin V-FITC (40X)反复冻融5次对于其检测效果无显著影响，但为取得良好的使用效果，3-6个月内推荐4°C保存，并适当注意避免反复冻融。
- 细胞球在外力的作用下容易变形或分散，PBS洗涤及换液等过程须轻缓，避免破坏或吹散3D细胞球。
- 不同种类的细胞球对凋亡或坏死诱导剂的耐受可能存在一定的差别，3D细胞球经凋亡或坏死诱导后，形态可能会发生一些变化，在染色前可以镜下观察细胞球的形态，可以酌情考虑是否选择形态比较完整的细胞球进行染色分析。

- 如果有细菌或真菌污染，会严重影响检测效果。
- 染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
- 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。
- 如果细胞收集过程中使用了胰酶，需注意设法去除残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解Beyo3D™ Annexin V-FITC，导致染色失败。
- 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：

本步骤以96孔板，每孔接种100μl细胞为例，如使用其它类型的多孔板，各试剂使用量请按照相应比例进行换算。

### 1. 3D细胞的准备。

在96孔3D培养板中每孔接种100μl细胞，细胞的接种量根据具体的实验方案，例如培养天数、需要的3D细胞球状体的大小等确定，按照3D细胞培养方案培养细胞，并按照实验设计进行一定的处理。96孔3D培养板推荐使用碧云天的3D细胞培养板包被液(C0365)、3D细胞培养包被试剂盒(U形底96孔板)(C0366)包被的U形底96孔板，或直接使用BeyoGold™ 超低吸附96孔板(FULA962/FULA961)、BeyoGold™ 超低吸附黑色透明底96孔板(平底带盖，独立包装)(FULA965)等。

注：为达到最佳的染色效果，具体的细胞球培养时间、药物等干预时间可以根据细胞种类、具体的实验需求等进行调整。例如，对于HCT-116细胞，通常接种培养48小时形成较为紧实的细胞球后进行干预和染色效果较好。

### 2. 3D细胞Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342染色。

a. **Beyo3D™ Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342检测工作液的用量：**对于6、12、24、96孔板，每孔Beyo3D™ Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342检测工作液的用量分别为0.5~1ml、200~500 μl、100~200 μl和50~100 μl。

b. **Beyo3D™ Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342检测工作液的配制：**如下表所示，按照96孔板每孔需要100 μl检测工作液的量，用Beyo3D™ Annexin V-FITC结合液稀释配制适量的Beyo3D™ Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342检测工作液。

样品数	10 samples	20 samples	50 samples
Beyo3D™ Mito-Tracker Red CMXRos (100X)	10μl	20μl	50μl
Beyo3D™ Annexin V-FITC (40X)	25μl	50μl	125μl
Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(100X)	10μl	20μl	50μl
Beyo3D™ Annexin V-FITC结合液	955μl	1.91ml	4.775ml
<b>检测工作液</b>	<b>1ml</b>	<b>2ml</b>	<b>5ml</b>

注1：配制好的Beyo3D™ Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342检测工作液必须一次使用完毕，不能冻存。Hoechst 33342染色液可以选择性加入，不加入也是可以的。

注2：Beyo3D™ Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342检测工作液中的Annexin V-FITC、Mito-Tracker Red CMXRos和Hoechst 33342的最终浓度可以根据不同细胞系和实验体系通过预实验进行优化。Annexin V-FITC、Mito-Tracker Red CMXRos和Hoechst 33342的工作浓度通常为0.5-2X，推荐使用浓度为1X。

c. **染色：**小心吸除原有细胞培养液，沿着孔壁缓慢加入100 μl Beyo3D™ Annexin V-FITC/Mito-Tracker Red CMXRos/Hoechst 33342检测工作液，在适宜于细胞培养的温度避光孵育15分钟。

注1：为达到最佳的染色效果，具体染色时间可以根据细胞种类、培养天数、细胞球状大小等进行调整。

注2：任何液体吸除或加入的过程须轻缓，避免破坏或吹散3D细胞球。3D细胞球通常位于在培养板或培养皿等培养器皿的底部，培养板在对着光线时能看到孔内针尖大小的乳白色细胞球，吸除孔内液体时须尽量避开细胞球以免将细胞球吸走。可以根据孔内液体的体积将移液器调至合适的量程，例如需要吸除的液体体积为100μl，将200微升移液器的量程调整到50-70微升，避开细胞球从液体边缘缓慢、分次吸除。孔内加入液体时，沿着孔壁小心、缓慢加入，避免破坏或吹散3D细胞球。

### 3. 荧光检测。

a. **荧光显微镜检测。**孵育结束后，小心去除孔内染色液，沿着孔壁缓慢加入适量的PBS洗涤细胞球1次并更换为完全培养液，随后在荧光显微镜下观察荧光染色效果。注意整个过程均需注意避光操作。

注：任何液体吸除或加入的过程须轻缓，避免破坏或吹散3D细胞球。

b. **荧光酶标仪检测。**孵育结束后，小心吸除孔内染色液，沿着孔壁缓慢加入适量的PBS洗涤细胞球1次并更换为完全培养液，随后用荧光酶标仪检测(Mito-Tracker Red CMXRos为红色荧光，Ex/Em:579/599nm；Annexin V-FITC为绿色荧光，Ex/Em=490/525nm)。通过对比对照组两种荧光探针的RFU (Relative fluorescence units)，可以计算出正常细胞与凋亡细胞的相对比例关系。

注：任何液体吸除或加入的过程须轻缓，避免破坏或吹散3D细胞球。

## 参考文献：

1. Kapał czyńska M, Kolenda T, Przybył a W, Zają czkowska M, Teresiak A, et al. Arch Med Sci. 2018. 14(4):910-919.
2. Riedl A, Schleder M, Pudelko K, Stadler M, Walter S, et al. J Cell Sci. 2017. 130(1):203-218.
3. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Int J Mol Sci. 2018. 19(1):181.
4. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. J Cell Physiol. 2015. 230(1):16-26.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0365	3D细胞培养板包被液	20/100ml
C0366S	3D细胞培养包被试剂盒(U形底96孔板)	5plts
C0049	Cell Counting Kit-3D (CCK-3D试剂盒)	100/500/2500次
C0061	CellTiter-Lumi™发光法3D细胞活力检测试剂盒	100/500/2500次
C0371	Matrix-Gel™基质胶(标准型, 含酚红)	1/5/10/50ml
C0372	Matrix-Gel™基质胶(标准型, 不含酚红)	1/5/10/50ml
C0376	Matrix-Gel™基质胶(低生长因子, 不含酚红)	1/5/10/50ml
C0383	Matrix-Gel™基质胶(高浓度, 不含酚红)	1/5/10/50ml
C0387	Matrix-Gel™基质胶(高浓度低生长因子, 不含酚红)	1/5/10/50ml
C0392	Matrix-Gel™基质胶(干细胞用, 不含酚红)	1/5/10/50ml
C0396	Matrix-Gel™基质胶(类器官用, 不含酚红)	1/5/10/50ml
C1341	Beyo3D™ DAPI染色液	10/50/200ml
C1345	Beyo3D™ Hoechst 33342染色液	10/50/200ml
C1352	Beyo3D™ PI染色液	10/50/200ml
C1356	Beyo3D™ YO-PRO-1染色液	10/50/200ml
C1363	Beyo3D™ YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒	100/500次
C1367	Beyo3D™ Calcein AM染色液(100X)	0.1/0.5/2ml
C1371	Beyo3D™ Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	100/500次
C1375	Beyo3D™ Calcein/PI/Hoechst细胞活力检测试剂盒	100/500次
C1379	Beyo3D™ 7-AAD细胞活力检测试剂盒	100/500次
C1383	Beyo3D™ Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	20/50/100次
C1387	Beyo3D™ Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	20/50/100次
C1391	Beyo3D™ Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒	20/50次
C1395	Beyo3D™ Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	20/50/100次
C1399	Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green 细胞凋亡检测试剂盒	20/50次
C1403	Beyo3D™活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	20/50次
C1407	Beyo3D™ Caspase-3活性与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒	20/50次
C1411	Beyo3D™线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	20/50次
C1415	Beyo3D™细胞膜红色荧光染色试剂盒(DiI)	100/500次
C1419	Beyo3D™细胞膜绿色荧光染色试剂盒(DiO)	100/500次
C1423	Beyo3D™细胞膜远红荧光染色试剂盒(DiD)	100/500次
P0121	BeyoCUBIC™ 3D细胞透明化试剂盒	5/25ml
FULA061	BeyoGold™超低吸附6孔板(平底带盖, 独立包装)	1/5/20个
FULA122	BeyoGold™超低吸附12孔板(平底带盖, 独立包装)	1/5/20个
FULA243	BeyoGold™超低吸附24孔板(平底带盖, 独立包装)	1/5/20个
FULA485	BeyoGold™超低吸附48孔板(平底带盖, 独立包装)	1/5/20个
FULA961	BeyoGold™超低吸附96孔板(平底带盖, 独立包装)	1/6/24个
FULA962	BeyoGold™超低吸附96孔板(圆底带盖, 独立包装)	1/6/24个
FULA965	BeyoGold™超低吸附黑色透明底96孔板(平底带盖, 独立包装)	1/6/24个
FULA981	BeyoGold™超低吸附384孔板(平底带盖, 独立包装)	1/6/24个
FULA985	BeyoGold™超低吸附黑色透明底384孔板 (平底带盖, 独立包装)	1/6/24个
FULA035-10pcs	BeyoGold™超低吸附35mm培养皿	10个/袋
FULA035-40pcs	BeyoGold™超低吸附35mm培养皿	10个/袋, 4袋/箱
FULA060-10pcs	BeyoGold™超低吸附60mm培养皿	10个/袋
FULA060-40pcs	BeyoGold™超低吸附60mm培养皿	10个/袋, 4袋/箱

FULA100-10pcs	BeyoGold™超低吸附100mm培养皿	10个/袋
FULA100-40pcs	BeyoGold™超低吸附100mm培养皿	10个/袋, 4袋/箱

Version 2024.10.23