

Beyo3D™ YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1363S	Beyo3D™ YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒	100次
C1363M	Beyo3D™ YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒	500次

产品简介:

- 碧云天研发生产的Beyo3D™ YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒(Beyo3D™ Apoptosis and Necrosis Detection Kit with YO-PRO-1 and PI), 简称Beyo3D™ YP1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒, 是一种基于DNA绿色荧光探针YO-PRO-1 (YP1) 和红色荧光染料碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)的双荧光染色法快速、便捷地检测3D培养的细胞球或类器官中凋亡细胞和坏死细胞的试剂盒。仅需染色10分钟, 就可在荧光显微镜下观察到凋亡或坏死细胞中非常明亮的细胞核绿色荧光染色, 和坏死细胞中非常明亮的细胞核红色荧光染色。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。
- YO-PRO-1, 又名恶唑黄(Oxazole yellow), 简称YP1, 是一种对正常动物细胞膜没有通透性而对于凋亡细胞的细胞膜有通透性的DNA绿色荧光染料, 常用于细胞凋亡的检测。YO-PRO-1是一种非细胞膜穿透性的并对DNA具有高亲和力的羧花青单体绿色荧光染料, 在没有与DNA结合的时候基本上没有荧光, 而与DNA结合后可以发出明亮的绿色荧光。在细胞凋亡发生时, 细胞膜通透性发生改变, 此时YO-PRO-1可以进入细胞内与DNA结合, 发出明亮的绿色荧光, 因此常使用本荧光染料用于分析和鉴定凋亡细胞。需要注意的是YO-PRO-1也能染色坏死细胞, 因此需要和对坏死细胞特异性荧光染色的PI进行双染才能有效判定细胞凋亡。
- PI, 即碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸红色荧光染料, 只能染色细胞膜完整性丧失的坏死细胞, 并与核酸结合发出明亮的红色荧光。因此, YO-PRO-1与碘化丙啶(PI)联合使用, 可以同时进行凋亡细胞和坏死细胞的检测, 凋亡细胞呈现绿色荧光, 坏死细胞同时呈现红色和绿色荧光阳性, 活细胞很少或几乎没有荧光。
- YO-PRO-1与DNA结合后的最大激发光波长为491nm, 最大发射波长为509nm; PI与DNA结合后的最大激发光波长为535nm, 最大发射光波长为617nm。
- **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10-30分钟即可完成。**3D细胞球经凋亡、坏死等诱导处理后, 仅需将本试剂盒中的Beyo3D™ YO-PRO-1染色液(100X)和Beyo3D™ PI染色液(100X)用检测缓冲液按照比例配制后避光孵育10分钟, 就可进行后续的荧光显微镜拍照或者荧光酶标仪定量等荧光检测和分析。本产品对3D培养的HCT-116细胞的染色效果参考图1。

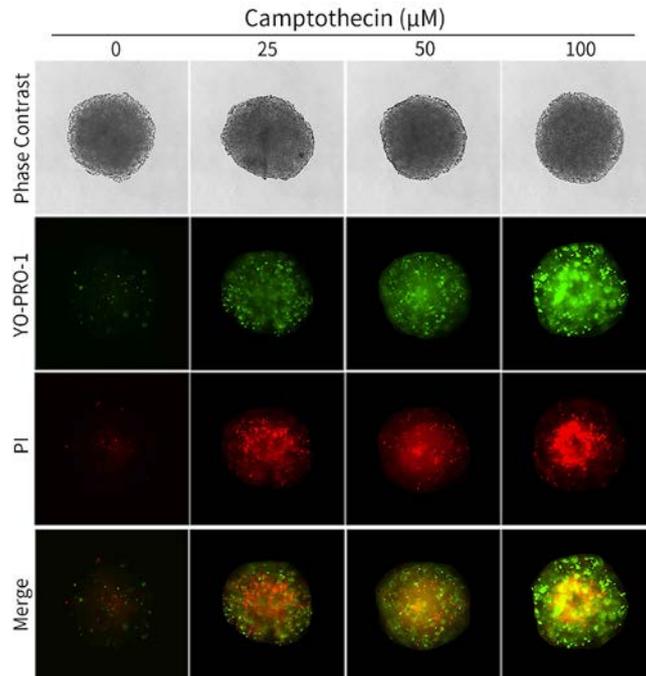


图1. 碧云天Beyo3D™ YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒(C1363)对于3D培养的HCT-116细胞的染色效果图。5000个HCT-116细胞在使用碧云天3D细胞培养包被试剂盒(U形底96孔板) (C0366)包被的U形底96孔板中培养48小时, 不同浓度

Camptothecin (Topoisomerase抑制剂) (SC0141)诱导细胞凋亡、坏死过夜, 然后吸除培养液后未经固定处理直接加入1X的Beyo3D™ YP1/PI检测工作液, 染色10分钟。结果显示, Beyo3D™ YO-PRO-1/PI细胞凋亡与坏死检测试剂盒对于药物诱导凋亡和坏死的3D细胞染色效果清晰、明亮, Beyo3D™ YO-PRO-1染色的凋亡细胞核为绿色荧光; 坏死细胞的细胞核则同时被Beyo3D™ YO-PRO-1和Beyo3D™ PI染色, 红色荧光和绿色荧光重叠后呈现橙黄色, 且3D细胞球内部的凋亡和坏死更严重一些, 同时无药物处理组无明显YO-PRO-1和PI荧光染色。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。

- 细胞死亡包括凋亡(Apoptosis)、坏死(Necrosis)、焦亡(Pyroptosis)等多种形式。其中受调控的细胞死亡被称为程序性细胞死亡(Programmed Cell Death, PCD)。程序性细胞死亡包括凋亡、细胞程序性坏死(Programmed necrosis)或坏死性凋亡(Necroptosis)和焦亡等。从细胞膜的完整性角度来看, 凋亡的特征是细胞膜的完整性会保留, 而坏死的特征是细胞膜的完整性会丧失。
- 细胞凋亡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, 不会导致炎症反应, 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。细胞凋亡的主要特征包括细胞膜保持完整、细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻(Annexin V染色阳性)、基因组DNA片段化(DNA fragmentation) (即产生DNA ladder并且TUNEL染色阳性)、电镜或荧光染色时细胞核碎裂或致密浓染、Caspase 3等激活、线粒体膜电位下降、细胞色素C从线粒体内释放等。
- 坏死通常被认为是一种偶发性的并且是被动的细胞死亡, 如物理性或化学性的损害因素及缺氧与营养不良等都可以导致细胞坏死。坏死细胞初期细胞膜通透性增高, 致使细胞肿胀, 细胞器变形或肿大, 早期细胞核无明显形态学变化, 最后细胞破裂, 细胞膜丧失完整性, 释放出细胞内容物, 并常引起炎症反应, 但不会出现细胞凋亡或自噬标志物。通常, 凋亡对生命体是有利的, 而坏死很可能是有害甚至是致命的。凋亡的晚期也可以发生继发性坏死(Secondary necrosis)。受细胞程序性调控的坏死(Programmed necrosis)被称为Necroptosis。
- 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, 也能更真实的反应细胞与细胞间、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100μl Beyo3D™ YP1/PI检测工作液, 本试剂盒小包装可以进行100个样品的检测, 中包装可以进行500个样品的检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C1363S-1	Beyo3D™ YO-PRO-1染色液(100X)	100μl
C1363S-2	Beyo3D™ PI染色液(100X)	100μl
C1363S-3	检测缓冲液	10ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1363M-1	Beyo3D™ YO-PRO-1染色液(100X)	500μl
C1363M-2	Beyo3D™ PI染色液(100X)	500μl
C1363M-3	检测缓冲液	50ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 至少一年有效。Beyo3D™ YO-PRO-1染色液(100X)和Beyo3D™ PI染色液(100X)须避光保存。检测缓冲液4°C保存, 至少一个月内有效。

注意事项:

- 本试剂盒反复冻融可能会降低染色效果, 为保证最佳使用效果, 请尽量避免反复冻融, 第一次解冻后可以适当分装保存。
- 细胞球在外力的作用下容易变形或分散, 固定、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。
- 荧光染料都存在淬灭的问题，建议染色后尽量当天完成检测。
- 检测缓冲液应在无菌环境中使用，否则可能会被微生物污染而影响使用效果，甚至无法继续使用。
- 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细胞固定(选做)。

小心去除孔内培养液，每孔加入100μl免疫染色固定液(P0098)，室温固定细胞10分钟。

注1：通常不进行固定也能获得良好的染色效果。为达到最佳的使用效果，具体的固定时间可以根据细胞种类、培养天数、细胞球状体大小等进行调整。

注2：3D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. 3D细胞YP1/PI染色。

a. 如果进行了细胞固定，小心去除免疫染色固定液；对于活细胞染色，小心去除原有细胞培养液。

注：任何液体吸除或加入的过程须轻柔，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。

b. **Beyo3D™ YP1/PI检测工作液的用量：**对于6、12、24、96孔板，每孔Beyo3D™ YP1/PI检测工作液的用量分别为0.5~1ml、200~500μl、100~200μl和50~100μl。

c. **Beyo3D™ YP1/PI检测工作液的配制：**根据样品数量和每个样品所需工作液的体积，计算出Beyo3D™ YP1/PI检测工作液的总体积。以荧光显微镜检测为例，每个样品的Beyo3D™ YP1/PI检测工作液的体积为100μl，参考下表配制Beyo3D™ YP1/PI检测工作液。

样品数	10 samples	50 samples	100 samples
Beyo3D™ YO-PRO-1染色液(100X)	10μl	50μl	100μl
Beyo3D™ PI染色液(100X)	10μl	50μl	100μl
检测缓冲液	0.98ml	4.9ml	9.8ml
Beyo3D™ YP1/PI检测工作液	1ml	5ml	10ml

注1：本试剂盒中提供的检测缓冲液在一段时间内可以维持细胞的正常状态，并给细胞提供一定的营养，效果通常比PBS或HBSS更好，也可以使用其它合适的溶液，如无血清培养液代替。

注2：Beyo3D™ YP1/PI检测工作液中的YP1和PI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。YO-PRO-1的工作浓度通常为0.5-5X，推荐使用浓度为1X；PI的工作浓度为0.1-4X，推荐使用浓度为1X。

d. **染色：**每孔加入100μl Beyo3D™ YP1/PI检测工作液，对于活细胞，在适宜于细胞培养的温度避光孵育10分钟；对于固定的细胞，可以室温避光孵育10分钟。

注：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。

4. 检测。

a. **荧光显微镜检测。**染色结束后，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PBS(如果进行了固定)或完全培养液(如果没有固定)，随后即可在荧光显微镜下观察。在荧光显微镜下观察荧光染色效果(YP1染色阳性细胞为绿色荧光，Ex/Em=491/509nm；PI染色阳性细胞为红色荧光，Ex/Em=535/617nm)。如有需要，也可进一步进行其它荧光的复染，例如使用Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(C1345)染色细胞核等。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柔，避免破坏或吹散3D细胞球。

b. **荧光酶标仪检测。**孵育结束后，用荧光酶标仪检测(YP1染色阳性细胞为绿色荧光，Ex/Em=491/509nm；PI染色阳性细胞为红色荧光，Ex/Em=535/617nm)。通过与对照组比较两种荧光探针的RFU(Relative fluorescence units)，可以计算出凋亡细胞与坏死细胞的相对比例关系。

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.
5. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Int J Mol Sci. 2015. 16(3):5517-27.

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 2024.12.09