

## Beyo3D™ Calcein/PI/Hoechst细胞活力检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1375S	Beyo3D™ Calcein/PI/Hoechst细胞活力检测试剂盒	100次
C1375M	Beyo3D™ Calcein/PI/Hoechst细胞活力检测试剂盒	500次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的Beyo3D™ Calcein/PI/Hoechst细胞活力检测试剂盒(Beyo3D™ Calcein/PI/Hoechst Cell Viability Assay Kit, Beyo3D™ Calcein/PI/Hoechst Live/Dead Assay Kit, 或Beyo3D™ Calcein/PI/Hoechst Cytotoxicity Assay Kit), 是一种基于Calcein-AM (钙黄绿素)、PI (碘化丙啶)和Hoechst 33342的三荧光染色法快速、便捷地检测3D培养的细胞球或类器官中活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非常明亮的活细胞绿色荧光染色、非常明亮的坏死细胞中细胞核红色荧光染色, 以及所有细胞中细胞核蓝色荧光染色。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。
- Calcein AM (Calcein Acetoxymethyl Ester, 中文名称为钙黄绿素AM或钙黄绿素乙酰氧基甲酯), 是一种可以对活细胞进行荧光染色的细胞染色试剂, Calcein AM是在Calcein (钙黄绿素)的基础上增加了乙酰氧基甲酯(AM)基团, 加强了疏水性, 因此能够很容易穿透细胞膜。Calcein AM本身并没有荧光, 进入细胞后被活细胞中内源性酯酶水解生成具有强负电荷的不能通透细胞膜的极性分子钙黄绿素(Calcein), 从而被滞留在细胞内, 而Calcein可发出强绿色荧光。由于死细胞缺乏酯酶或酯酶活性很低, Calcein AM进入细胞后含有酯酶的活细胞可以产生Calcein, 而死细胞不能或很少能产生Calcein, 因此仅活细胞会被染色为强绿色荧光, 死细胞不能被染色或者染色非常弱。核酸红色荧光染料碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)由于不能穿透活细胞的细胞膜, 而只能染色细胞膜完整性被破坏的死细胞。因此, Calcein AM与碘化丙啶联合使用, 对活细胞和死细胞同时进行双重荧光染色, 就能用于细胞活性与细胞毒性的检测。Hoechst 33342是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料, 对细胞的毒性较低, 常用于普通的细胞核染色。碧云天同时提供不含Hoechst 33342的Beyo3D™ Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒(C1371)。
- Calcein AM水解产物Calcein的最大激发光波长为494nm, 最大发射光波长为517nm; PI-DNA复合物的最大激发光波长为535nm, 最大发射光波长为617nm。Hoechst 33342和双链DNA结合后, 最大激发波长为350nm, 最大发射波长为461nm。
- **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细胞球经坏死等诱导处理后, 仅将本试剂盒中的Beyo3D™ Calcein AM染色液(100X)、Beyo3D™ PI染色液(100X)和Beyo3D™ Hoechst 33342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。

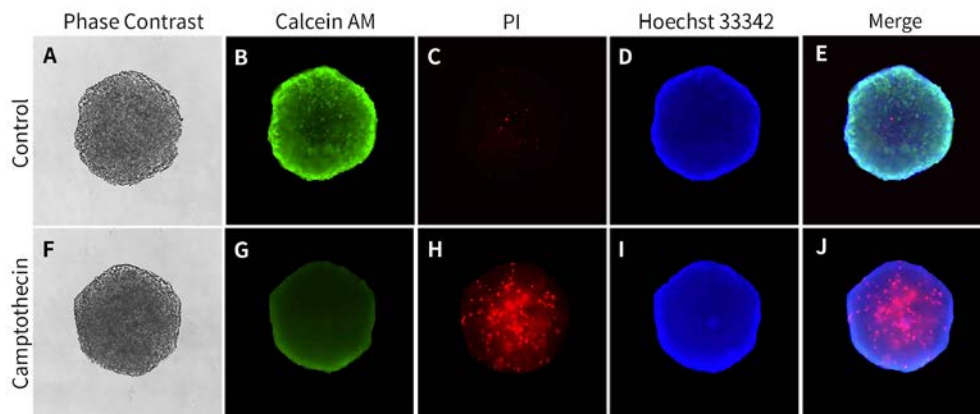


图1. 碧云天Beyo3D™ Calcein/PI/Hoechst细胞活力检测试剂盒(C1375)对于3D培养的HCT-116细胞的染色效果图。5000个HCT-116细胞在使用碧云天3D细胞培养包被试剂盒(U形底96孔板) (C0366)包被的U形底96孔板中培养48小时, 100 μM Camptothecin (Topoisomerase抑制剂) (SC0141)诱导细胞球凋亡、坏死过夜, 洗涤细胞球一次后加入1X的Beyo3D™细胞活力检测工作液, 染色10分钟。结果显示, Beyo3D™ Calcein/PI/Hoechst细胞活力检测试剂盒对于药物诱导坏死后的3D细胞染色效果清晰、明亮, Calcein AM染色的活细胞可见明显差别(B、G), PI染色的3D细胞球内部坏死更严重一些(H、J), 同时Control组无明显PI荧光染色(C、E), Hoechst 33342染色的细胞核总体基本一致(I、D)。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。

- 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为可信的研究结果，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™细胞活力检测工作液，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
C1375S-1	Beyo3D™ Calcein AM染色液(100X)	100μl
C1375S-2	Beyo3D™ PI染色液(100X)	100μl
C1375S-3	Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(100X)	100μl
C1375S-4	检测缓冲液	10ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1375M-1	Beyo3D™ Calcein AM染色液(100X)	500μl
C1375M-2	Beyo3D™ PI染色液(100X)	500μl
C1375M-3	Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(100X)	500μl
C1375M-4	检测缓冲液	50ml
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20℃保存，一年有效。Beyo3D™ Calcein AM染色液(100X)、Beyo3D™ PI染色液(100X)和Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(100X)都须避光保存。

### 注意事项：

- 本产品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柔，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。
- Beyo3D™ Calcein AM染色液(100X)在潮湿环境中容易分解，首次使用时建议适当分装并-20℃密封保存。
- 由于Beyo3D™ Calcein AM染色液(100X)在水溶液中不稳定，Beyo3D™细胞活力检测工作液须现配现用，不能配制后冻存。
- 培养液中的血清和酚红对Calcein AM的染色可能有一定的影响，使荧光背景增强，建议在加入Beyo3D™细胞活力检测工作液前适当洗涤细胞。
- 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细胞染色。

- a. **Beyo3D™细胞活力检测工作液的用量**: 对于6、12、24、96孔板, 每孔Beyo3D™细胞活力检测工作液的用量分别为0.5~1ml、200~500μl、100~200μl和50~100μl。
- b. **Beyo3D™细胞活力检测工作液的配制**: 如下表所示, 按照每孔需要100μl Beyo3D™细胞活力检测工作液的量, 用检测缓冲液稀释配制适量的Beyo3D™细胞活力检测工作液。

样品数	10 samples	50 samples	100 samples
Beyo3D™ Calcein AM染色液(100X)	10μl	50μl	100μl
Beyo3D™ PI染色液(100X)	10μl	50μl	100μl
Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(100X)	10μl	50μl	100μl
检测缓冲液	0.97ml	4.85ml	9.7ml
<b>Beyo3D™细胞活力检测工作液</b>	<b>1ml</b>	<b>5ml</b>	<b>10ml</b>

**注1**: 配制好的Beyo3D™细胞活力检测工作液必须一次使用完毕, 不能冻存。

**注2**: Beyo3D™细胞活力检测工作液中的Calcein AM、PI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。Calcein AM、PI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, 沿着孔壁缓慢加入适量的PBS洗涤细胞球1次, 沿着孔壁缓慢加入100μl Beyo3D™细胞活力检测工作液, 在适宜于细胞培养的温度避光孵育10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(Calcein AM为绿色荧光, Ex/Em=494/517nm; PI为红色荧光, Ex/Em=535/617nm; Hoechst 33342为蓝色荧光, Ex/Em=350/461nm)。通过对比对照组三种荧光探针的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。

**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, Pudenko 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