

Beyo3D™活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1403S	Beyo3D™活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	20次
C1403M	Beyo3D™活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	50次

产品简介:

- 碧云天研发生产的Beyo3D™活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒(Beyo3D™ Caspase-3 Activity and Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit for Live Cell), 是基于线粒体膜电位依赖性的深红荧光探针Mito-Tracker Deep Red 633联合Caspase-3酶的荧光底物GreenNuc™ Caspase-3 Substrate来检测细胞球或类器官线粒体膜电位以及细胞内Caspase-3酶活性的试剂盒。本试剂盒可快速、便捷地检测3D培养的细胞球或类器官线粒体膜电位变化和细胞内Caspase-3酶活性。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的线粒体膜电位红色荧光差异和凋亡细胞细胞核绿色荧光染色。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。
- 本试剂盒基于荧光底物GreenNuc™ Caspase-3 Substrate检测Caspase-3酶活性的原理如下。底物GreenNuc™ Caspase-3 Substrate为偶联DNA绿色荧光染料的多肽DEVD, 该底物中的DEVD是caspase 3/7的识别序列, 并带有大量负电荷。这些负电荷和DNA带有的负电荷相互排斥, 使底物中的DNA绿色荧光染料不能结合DNA, 也就不能被激发产生绿色荧光。最初没有荧光的底物穿过细胞膜进入细胞质, 在凋亡细胞中被Caspase-3/7识别并剪切, 释放出活化的DNA绿色荧光染料分子。活化的DNA绿色荧光染料分子迁移进入细胞核, 与DNA结合后, 形成GreenNuc™-DNA复合物, 就可以被激发而产生明亮的绿色荧光。
- 本试剂盒中Mito-Tracker Deep Red 633, 也称MitoTracker™ Deep Red FM检测线粒体膜电位的原理如下。Mito-Tracker Deep Red 633是一种线粒体深红荧光探针, 其在线粒体内的积累依赖于线粒体膜电位(与JC-1、TMRE和Rhodamine 123相同)。正常细胞中, Mito-Tracker Deep Red 633对线粒体进行特异性染色, 呈明亮的深红荧光; 细胞发生凋亡时, 线粒体膜电位下降, 染料在线粒体内的积累减少, 荧光减弱或消失。
- 本试剂盒通过检测GreenNuc™-DNA复合物的绿色荧光(Ex/Em=500/530nm)和依赖于线粒体膜电位的Mito-Tracker Deep Red 633的深红荧光(Ex/Em=622/648nm), 显示细胞的Caspase-3酶活性以及线粒体膜电位, 从而判定细胞凋亡的发生。
- **本试剂盒可以实时监测凋亡情况。**传统的Caspase活性检测试剂盒, 通常需要裂解细胞或组织样品后进行显色或荧光检测; 通过Western检测Caspase本身的和剪切后的蛋白表达情况, 也只能检测Caspase的表达情况, 从一定程度上反映酶活性。基于荧光标记的Caspase抑制剂的检测技术(Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspases, FLICA)可以进入活细胞检测Caspase活性, 但其荧光探针本身就是不可逆的Caspase抑制剂, 所以无法在活细胞中实时监测Caspase的活力。而本试剂盒中提供的荧光底物GreenNuc™ Caspase-3 Substrate对细胞活性没有明显的抑制作用, 不影响Caspase的表达, 不抑制细胞的凋亡过程, 能实时监测细胞凋亡。
- **本试剂盒功能强大。**使用本试剂盒检测Caspase-3活性的同时, 还能够实时监测细胞内线粒膜电位的变化。
- **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™ GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (100X)和Beyo3D™ Mito-Tracker Deep Red 633 (100X)按照相应比例用检测缓冲液配制成为Beyo3D™ GreenNuc™ Caspase-3 Substrate/Mito-Tracker Deep Red 633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。

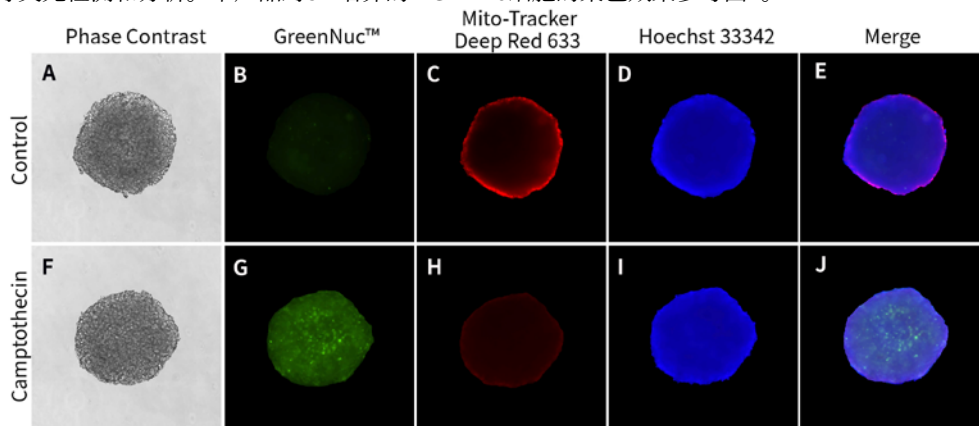


图1. 碧云天Beyo3D™活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒(C1403)对于3D培养的HCT-116细胞的染色效果图。5000个HCT-116细胞在使用碧云天3D细胞培养包被试剂盒(U形底96孔板) (C0366)包被的U形底96孔板中培养48小时, 100μM Camptothecin (Topoisomerase抑制剂) (SC0141)诱导细胞凋亡、坏死过夜, 然后吸除培养液后直接加入1X的Beyo3D™ GreenNuc™ Caspase-3 Substrate/Mito-Tracker Deep Red 633检测工作液及Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(C1345) (各染色液均可混合配制在一起, 图中各染料可混合配制后使用), 染色15分钟。结果显示, Beyo3D™活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位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, GreenNuc™ Caspase-3 Substrate绿色染色的凋亡细胞核(B、G)和Mito-Tracker Deep Red 633红色染色的线粒体(C、H)可见明显差别, 同时Control组无明显GreenNuc™ Caspase-3 Substrate荧光染色(B、E)。Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(C1345)染色的细胞核总体基本一致(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。

- Caspase (cysteine-dependent aspartate-specific proteases)的全称为天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶, 存在于细胞质中, 主要利用半胱氨酸(Cysteine)侧链选择性地高效切割含有天冬氨酸(Aspartate)的多肽底物, 在介导细胞凋亡(Apoptosis)过程中起重要作用, 并参与细胞的炎症、生长和分化等过程。Caspase-3也称CPP32、Yama或apopain, 属于caspase家族的CED-3亚家族(CED-3 subfamily), 是哺乳动物细胞中研究最多的一个caspase。Caspase-3是细胞凋亡过程中的一个关键酶, 可以直接特异性切割多种底物, 包括PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase)、ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease)、proCaspase-6、7和9、gelsolin和fodrin等。这些由Caspase-3介导的蛋白剪切是细胞凋亡分子机制的重要组成部分。同时Caspase-3还参与细胞核凋亡过程, 如染色质固缩(Chromatin condensation), DNA片段化(DNA fragmentation)等。另外, Caspase-3对凋亡过程中的细胞起泡(Cell blebbing)也起到了关键作用。
- 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100μl Beyo3D™ GreenNuc™ Caspase-3 Substrate/Mito-Tracker Deep Red 633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
C1403S-1	Beyo3D™ GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (100X)	20μl
C1403S-2	Beyo3D™ Mito-Tracker Deep Red 633 (100X)	20μl
C1403S-3	检测缓冲液	2ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1403M-1	Beyo3D™ GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (100X)	50μl
C1403M-2	Beyo3D™ Mito-Tracker Deep Red 633 (100X)	50μl
C1403M-3	检测缓冲液	5ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。Beyo3D™ GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (100X)和Beyo3D™ Mito-Tracker Deep Red 633 (100X)须避光保存。

注意事项:

- Beyo3D™ GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (100X)不是很稳定, 应尽量避免反复冻融(通常不要超过三次)。
- 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。
- 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GreenNuc™ Caspase-3 Substrate/Mito-Tracker Deep Red 633染色。

a. Beyo3D™ GreenNuc™ Caspase-3 Substrate/Mito-Tracker Deep Red 633检测工作液(Working Solution)的用量：

对于6、12、24、96孔板，每孔Working Solution的用量分别为0.5~1ml、200~500μl、100~200μl和50~100μl。

b. Working Solution的配制：如下表所示，按照每孔需要100μl Working Solution的量，用检测缓冲液(Assay Buffer)稀释配制适量的Working Solution。

	10 samples	20 samples	50 samples
Beyo3D™ GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (100X)	10μl	20μl	50μl
Beyo3D™ Mito-Tracker Deep Red 633 (100X)	10μl	20μl	50μl
Assay Buffer	980μl	1.96ml	4.9ml
Working Solution	1ml	2ml	5ml

注1：配制好的Working Solution必须一次使用完毕，不能冻存。

注2：Working Solution中的GreenNuc™ Caspase-3 Substrate和Mito-Tracker Deep Red 633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。GreenNuc™ Caspase-3 Substrate和Mito-Tracker Deep Red 633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100μl Working Solution，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。

注3：如有必要后续可以使用Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(C1345)等进行染色，也可以使用Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(C1345)替代本试剂盒中的Assay Buffer用于配制Working Solution从而同时进行3种荧光探针的染色。

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(GreenNuc™-DNA为绿色荧光，Ex/Em=500/530nm；Mito-Tracker Deep Red 633为红色荧光，Ex/Em=622/648nm)。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.
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)	5p/1ts

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