

## Beyo3D™细胞膜绿色荧光染色试剂盒(DiO)

产品编号	产品名称	包装
C1419S	Beyo3D™细胞膜绿色荧光染色试剂盒(DiO)	100次
C1419M	Beyo3D™细胞膜绿色荧光染色试剂盒(DiO)	500次

### 产品简介:

- 碧云天的Beyo3D™细胞膜绿色荧光染色试剂盒(DiO), 即Beyo3D™ Cell Plasma Membrane Staining Kit with DiO (Green Fluorescence), 是以DiO为荧光探针, 并提供了染色增强剂和染色缓冲液, 可快速、便捷地用于3D培养的细胞球或类器官细胞膜染色的试剂盒。仅需染色15分钟, 就可在荧光显微镜下观察到非常明亮的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。
- DiO即DiOC<sub>18</sub>(3), 全称为3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate, 分子式为C<sub>53</sub>H<sub>85</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 分子量为881.72, CAS号为34215-57-1, 是最常用的细胞膜荧光探针之一, 呈现绿色荧光。DiO是一种亲脂性羰花青(Carbocyanine)染料, 具有很长的亲脂性烃链, 进入细胞膜后可以侧向扩散逐渐使整个细胞的细胞膜被染色, 染色后非常稳定。
- DiO在进入细胞膜之前荧光非常弱, 仅当进入到细胞膜后才可以被激发出很强的荧光。DiO被激发后可以发出绿色的荧光, 最大激发波长为484nm, 最大发射波长为501nm。
- DiO被广泛用于正向或逆向的、活的或固定的神经等细胞或组织的示踪剂或长期示踪剂(Long-term tracer)。DiO毒性很低, 通常不会影响细胞的生存力(Viability)。DiO对于细胞膜染色的荧光强度通常要低于DiI, 有时对于某些经过固定的组织的染色效果欠佳。
- 本试剂盒提供了染色增强剂, 使细胞膜染色更加快速, 荧光染色更加明亮, 染色背景更低。
- 本试剂盒可以直接染色活的细胞或组织, 染色时间通常为15分钟。对于固定的细胞或组织, 通常宜使用配制在PBS中的4%多聚甲醛进行固定, 使用其它不适当的固定液会导致荧光背景较高。
- **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。**对于常规的3D细胞活细胞染色, 仅需将本试剂盒中的Beyo3D™ DiO (200X)和染色增强剂(400X)按照相应比例用染色缓冲液配制成Beyo3D™ DiO染色工作液, 避光孵育15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。也可以固定后再使用本产品进行染色。本产品对3D培养的HCT-116细胞的染色效果参考图1。

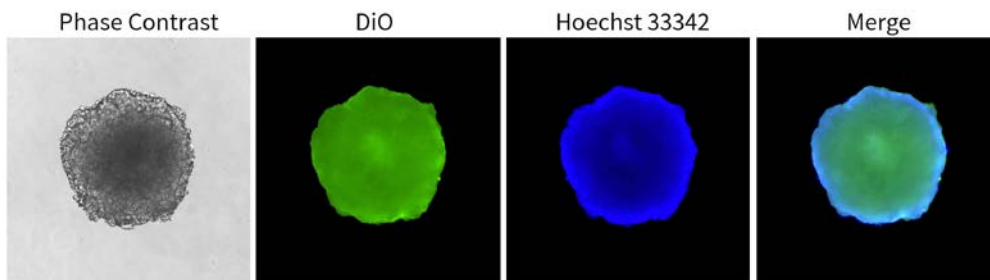


图1. 碧云天Beyo3D™细胞膜绿色荧光染色试剂盒(DiO) (C1419)对于3D培养的HCT-116细胞的染色效果图。5000个HCT-116细胞在使用碧云天3D细胞培养包被试剂盒(U形底96孔板) (C0366)包被的U形底96孔板中培养72小时, 吸除培养液后直接加入Beyo3D™ DiO染色工作液, 染色15分钟。结果显示, Beyo3D™细胞膜绿色荧光染色试剂盒(DiO)对于3D细胞染色效果清晰、明亮。蓝色荧光采用Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(C1345)进行染色。实际检测效果会因细胞株、实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- DiO染色后可以兼容免疫荧光实验。建议使用碧云天的免疫染色通透液(Saponin) (P0095)或使用洋地黄皂苷(Reagent grade) (ST1272)配制的不会溶解细胞膜的通透液进行通透, 其它去垢剂配制的通透液可能会溶解细胞膜上的脂类物质, 造成DiO失去结合位置, 最终导致DiO的染色失效。但通透也可能影响DiO在细胞膜上的定位并会增加细胞内的染色, 具体实验中需根据实验的需求选择合适的细胞通透液。
- 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™ DiO染色工作液，本试剂盒小包装和中包装分别可以进行100个和500个样品的检测。

### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C1419S-1	Beyo3D™ DiO (200X)	50μl
C1419S-2	染色增强剂(400X)	25μl
C1419S-3	染色缓冲液	10ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1419M-1	Beyo3D™ DiO (200X)	250μl
C1419M-2	染色增强剂(400X)	125μl
C1419M-3	染色缓冲液	50ml
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。Beyo3D™ DiO (200X)须避光保存。染色增强剂(400X)和染色缓冲液也可短期4°C保存。

### 注意事项：

- 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。
- 如果染色时间过长或染色后细胞继续培养，探针也可能进入细胞内而染色其它细胞器的膜。
- 染色缓冲液经过过滤除菌处理，在使用时须注意避免微生物污染，否则很可能严重影响染色效果。如果染色缓冲液发生浑浊等明显的微生物污染，就不能继续使用。
- 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等可以根据细胞种类、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)或4%多聚甲醛固定液(P0099)，室温固定细胞10分钟。

注1：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：固定细胞球等过程须轻缓，避免破坏或吹散3D细胞球。

#### 3. 3D细胞DiO染色。

a. **Beyo3D™ DiO染色工作液的用量：**对于6、12、24、96孔板，每孔Beyo3D™ DiO染色工作液的用量分别为0.5~1ml、200~500μl、100~200μl和50~100μl。

b. **Beyo3D™ DiO染色工作液的配制：**如下表所示，按照96孔板每孔需要100μl Beyo3D™ DiO染色工作液的量，用染色缓冲液稀释配制适量的Beyo3D™ DiO染色工作液。

样品数	10 samples	50 samples	100 samples
Beyo3D™ DiO (200X)	5μl	25μl	50μl
染色增强剂(400X)	2.5μl	12.5μl	25μl

染色缓冲液	992.5µl	4.962ml	9.925ml
<b>Beyo3D™ DiO染色工作液</b>	<b>1ml</b>	<b>5ml</b>	<b>10ml</b>

注1: 配制好的Beyo3D™ DiO染色工作液必须一次使用完毕, 不能冻存。

注2: Beyo3D™ DiO染色工作液中的DiO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。DiO的工作浓度通常为0.5-2X, 推荐使用浓度为1X。DiO的最终浓度改变时, 染色增强剂的用量可以不变。

- c. **染色:** 小心吸除原有细胞培养液, 沿着孔壁缓慢加入100µl Beyo3D™ DiO染色工作液, 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。

#### 4. 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(DiO为绿色荧光, Ex/Em=484/501nm)。

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. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybył a W, Zajączkowska M, Teresiak A, et al. Arch Med Sci. 2018. 14(4):910-919.
2. Riedl A, Schleder M, Pudielko 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	20/50次

	细胞凋亡检测试剂盒	
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 2024.10.24