

## Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1399S	Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green 细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1399M	Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green 细胞凋亡检测试剂盒	50次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒(Beyo3D™ Cell Apoptosis Detection Kit With Annexin V-mCherry And SYTOX Green), 是用细胞凋亡荧光探针Annexin V-mCherry联合死细胞绿色荧光探针SYTOX Green来同时检测细胞球或类器官中凋亡细胞和坏死细胞的一种细胞凋亡检测试剂盒。本试剂盒可快速、便捷地用于3D培养的细胞球或类器官中凋亡细胞和坏死细胞染色。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和坏死细胞中细胞膜红色荧光染色, 和坏死细胞中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。
- 本试剂盒检测的是Annexin V-mCherry红色荧光和SYTOX Green的绿色荧光, Annexin V-mCherry荧光蛋白的最大激发光波长为587nm, 最大发射光波长为610nm; SYTOX Green插入DNA后最大激发光波长为504nm, 最大发射光波长为523nm。
- Annexin是一类广泛分布于真核细胞细胞浆内钙离子依赖的磷脂结合蛋白, 参与细胞内的信号转导。但仅Annexin V被报道可以调控一些PKC的活性。
- Annexin V选择性结合磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, 简称PS)。磷脂酰丝氨酸主要分布在细胞膜内侧, 即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期, 不同类型的细胞都会把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面, 即细胞膜外侧。磷脂酰丝氨酸暴露到细胞表面后会促进凝血和炎症反应。而Annexin V和外翻到细胞表面的磷脂酰丝氨酸结合后可以阻断磷脂酰丝氨酸的促凝血和促炎症反应活性。
- SYTOX Green是一种非细胞膜渗透性的花菁荧光染料, 不能穿过具有生物活性的细胞质膜, 只能穿过死细胞膜的无序区域而到达细胞核, 并嵌入细胞的DNA双螺旋形成SYTOX Green-DNA复合物, 荧光强度增加500倍以上, 从而产生明亮的绿色荧光, 因此SYTOX Green仅能对死细胞染色, 从而被用来区分正常细胞与坏死细胞。
- Annexin V-mCherry相比藻红蛋白(Phycoerythrin, 简称PE)标记的Annexin V, 激发光谱更窄, 不会像PE那样在495nm左右产生红色荧光, 非常适合与其它绿色荧光一同检测。
- 正常细胞不会被Annexin V-mCherry和SYTOX Green所染色, 凋亡细胞和坏死细胞都会被Annexin V-mCherry所染色, 坏死细胞的细胞核被SYTOX Green染成明亮的绿色荧光。有报道称, 凋亡中晚期细胞的细胞核被SYTOX Green染成较弱的绿色荧光。
- **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-mCherry (40X)和Beyo3D™ SYTOX Green Staining Solution (100X)按照相应比例用Beyo3D™ Annexin V-mCherry Binding Buffer制成Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green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。

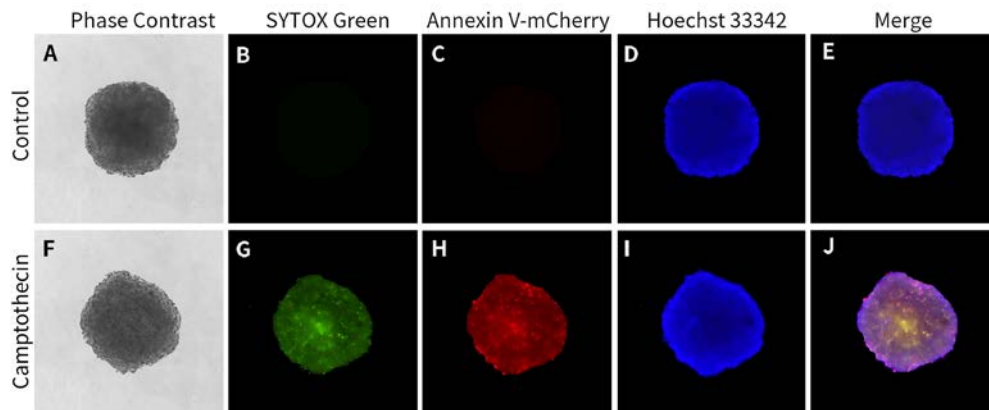


图1. 碧云天Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒(C1399)联合Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(C1345)对于3D培养的HCT-116细胞的染色效果图。5000个HCT-116细胞在使用碧云天3D细胞培养包被试剂盒(U形底96孔板)(C0366)包被的U形底96孔板中培养48小时, 100μM Camptothecin (Topoisomerase抑制剂) (SC0141)诱导细胞球凋亡、坏死过

夜，然后吸除培养液后直接加入1X的Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green检测工作液(Hoechst 33342染色液可混合配制在一起)，染色15分钟。结果显示，Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green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，SYTOX Green染色的坏死细胞核(B、G)、Annexin V-mCherry染色的凋亡或坏死细胞膜可见明显差别(C、H)，同时Control组无明显Annexin V-mCherry和SYTOX Green荧光染色(B、C、E)，Hoechst 33342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。

- 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。人血管抗凝剂Annexin V是一种35-36kDa Ca<sup>2+</sup>依赖性磷脂结合蛋白，对PS具有高亲和力。用红色荧光蛋白的mCherry标记的Annexin V (Annexin V-mCherry)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-mCherry染色。
- 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™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green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
C1399S-1	Beyo3D™ Annexin V-mCherry (40X)	50μl
C1399S-2	Beyo3D™ Annexin V-mCherry Binding Buffer	2ml
C1399S-3	Beyo3D™ SYTOX Green Staining Solution (100X)	20μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1399M-1	Beyo3D™ Annexin V-mCherry (40X)	125μl
C1399M-2	Beyo3D™ Annexin V-mCherry Binding Buffer	5ml
C1399M-3	Beyo3D™ SYTOX Green Staining Solution (100X)	50μl
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。Beyo3D™ Annexin V-mCherry (40X)和Beyo3D™ SYTOX Green Staining Solution (100X)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，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。
- 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-mCherry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-mCherry/SYTOX Green染色。

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

b. **Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green检测工作液的配制：**如下表所示，按照每孔需要100μl Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green检测工作液的量，用Beyo3D™ Annexin V-mCherry Binding Buffer稀释配制适量的Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green检测工作液。

样品数	10 samples	50 samples	100 samples
Beyo3D™ Annexin V-mCherry (40X)	25μl	125μl	250μl
Beyo3D™ SYTOX Green Staining Solution (100X)	10μl	50μl	100μl
Beyo3D™ Annexin V-mCherry Binding Buffer	965μl	4.825ml	9.65ml
<b>Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green检测工作液</b>	<b>1ml</b>	<b>5ml</b>	<b>10ml</b>

注1：配制好的Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green检测工作液必须一次使用完毕，不能冻存。

注2：Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green检测工作液中的Annexin V-mCherry和SYTOX Green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-mCherry和SYTOX Green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 Beyo3D™ Annexin V-mCherry/SYTOX Green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(Annexin V-mCherry为红色荧光，Ex/Em=587/610nm；SYTOX Green为绿色荧光，Ex/Em=504/523nm)。通过对比对照组两种荧光探针的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。

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-Véhot 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
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 2024.10.12