

BeyoCUBIC™ 3D细胞透明化试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0121S	BeyoCUBIC™ 3D细胞透明化试剂盒	5ml
P0121M	BeyoCUBIC™ 3D细胞透明化试剂盒	25ml

产品简介:

- 碧云天研发生产的BeyoCUBIC™ 3D细胞透明化试剂盒(BeyoCUBIC™ 3D Cell Culture Clearing Kit)是一种非常高效、便捷的对3D培养的细胞进行高质量、高透明度透明化处理的试剂盒。经本试剂盒透明化处理的3D细胞球，可以与后续的免疫荧光、免疫组化、常规或荧光染色、生物发光等结合起来，实现3D细胞球的三维成像，从而广泛用于生物、医学领域的研究。
- CUBIC (Clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis)是一种简单、有效的动物组织透明化处理方法[1]。碧云天的BeyoCUBIC™ 3D Cell Culture Clearing Kit和常规的CUBIC透明化效果基本一致。
- **本试剂盒适用范围广。**本试剂盒可用于各种方法培养出的3D细胞球，包括细胞悬滴培养板、超低吸附细胞培养板、Matrix-Gel™ 基质胶或Matrigel包被的平板等。
- **本试剂盒实验操作简单便捷。**使用本试剂盒提供的BeyoCUBIC™ 3D Solution简单浸泡3D细胞球10分钟，就可以轻松实现3D细胞球的透明化，无需使用任何特殊的仪器或设备。
- **本试剂盒透明化时间短。**3D细胞球先经4%多聚甲醛固定液(P0099)固定10分钟，固定结束后使用BeyoCUBIC™ 3D Solution作用10分钟即可完成3D细胞球的透明化。
- **本试剂盒处理的3D细胞球透明度高。**本试剂盒所使用的透明化试剂BeyoCUBIC™ 3D Solution具有很强的脱色和脱脂能力，能有效实现3D细胞球的透明化。本试剂盒和Thermo的CytoVista™ 3D Culture Clearing Reagent (V11326)、Abcam的3D cell Culture Clearing Reagent (ab243302)的使用效果基本一致。
- **本试剂盒兼容荧光蛋白和后续的荧光染色。**本试剂盒在使用过程中可以充分保护荧光蛋白的稳定性，不会导致EGFP、EYFP、mCherry等荧光蛋白的变性而失去荧光。3D培养的HCT-116和HeLa细胞经本试剂盒透明化后使用Beyo3D™ DAPI染色液(C1341)的染色效果对比参考图1。

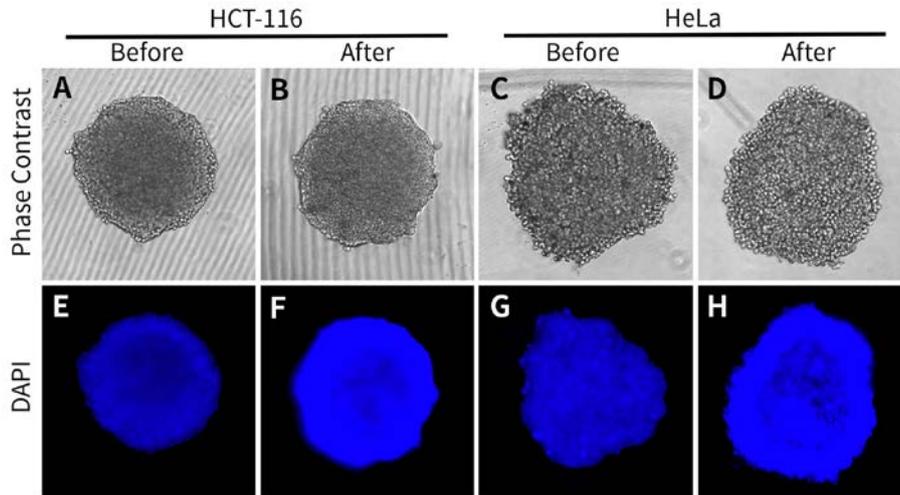


图1. 碧云天BeyoCUBIC™ 3D细胞透明化试剂盒(P0121)对3D培养的HCT-116和HeLa细胞透明化后DAPI染色的效果对比图。5000个HCT-116细胞和1500个HeLa细胞在碧云天的BeyoGold™超低吸附96孔板(圆底带盖, 独立包装) (FULA962)培养48小时, 细胞球经固定和透明化处理后(After), 使用Beyo3D™ DAPI染色液(C1341)进行染色, 以未经固定和透明化处理的细胞球作为对照(Before)。染色结果显示, 3D细胞球经透明化处理后的染色效果明显更佳。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 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[2-4]。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[5-6]。
- 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100μl细胞需要100μl 50% BeyoCUBIC™ 3D Solution，每5ml的BeyoCUBIC™ 3D Solution可以进行100个样品检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0121S-1	BeyoCUBIC™ 3D Solution	5ml
P0121S-2	100X Wash Buffer	0.6ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0121M-1	BeyoCUBIC™ 3D Solution	25ml
P0121M-2	100X Wash Buffer	3ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。BeyoCUBIC™ 3D Solution须-20°C避光保存，100X Wash Buffer可以4°C保存。

注意事项：

- BeyoCUBIC™ 3D Solution使用前，需室温静置至完全融化，确保液体透明并且没有沉淀。如果有晶体析出或溶液不透明，可以短时间置于55°C水浴溶解至完全透明并且没有沉淀。
- BeyoCUBIC™ 3D Solution在高温(>75°C)下失效，注意不可高温处理。
- BeyoCUBIC™ 3D Solution处理后细胞球会变软，导致细胞球在外力的作用下容易变形或分散，所以在整个实验过程中请缓慢、小心进行，以免吹散细胞球。
- BeyoCUBIC™ 3D Solution很容易清除掉油性笔迹。使用时请尽量盖紧盖子，并用Parafilm密封盖子，防止漏液。建议同时在管盖和管体上进行样品标记，以免样品信息丢失。
- BeyoCUBIC™ 3D Solution处理过程中如果出现浓烈的氨气气味，提示溶液可能已经失效，请及时更换新鲜的BeyoCUBIC™ 3D Solution，以免影响透明化效果。
- 为了保证BeyoCUBIC™ 3D Solution长期有效，需要-20°C避光保存。但使用时，为了方便观察细胞透明化效果，可以在非严格避光条件下对样品进行透明化处理。
- 本试剂盒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384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。

使用适合进行3D细胞培养的96孔板(FULA962)，每孔接种100μl细胞(如使用384孔板，每孔接种25μl细胞，具体用量视不同类型的384孔板而定)，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，同时设置不含细胞的培养液孔作为阴性对照，按照3D细胞培养方案培养细胞。如有需要，可加入药物处理细胞。

2. 透明化试剂的准备。

a. 50% BeyoCUBIC™ 3D Solution的配制。BeyoCUBIC™ 3D Solution和超纯水按1:1的比例混匀，例如取1ml BeyoCUBIC™ 3D Solution加入1ml超纯水中，混匀即得2ml 50% BeyoCUBIC™ 3D Solution，室温避光可保存1个月。

b. 1X Wash Buffer的配制：将100X Wash Buffer和PBS (C0221A)按1:100比例进行稀释，例如取1ml 100X Wash Buffer加入99ml PBS中，混匀即得100ml 1X Wash Buffer，室温下可保存1-2个月。

3. 3D细胞的固定。

去除孔内培养基，适量的PBS洗涤细胞1-2次，去除PBS，每孔加入100μl 免疫染色固定液(P0098)或4%多聚甲醛固定液(P0099)或其它适当的固定液，在适宜于细胞培养的温度或室温固定细胞10分钟。

注：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。通常细胞球较大时，固定时间需要适当延长。

4. 3D细胞的透明化。

去除固定液，每孔加入100μl 1X Wash Buffer清洗细胞球2次，每孔加入100μl 50% BeyoCUBIC™ 3D Solution，在适宜于细胞培养的温度避光孵育10分钟。

注：为达到最佳的透明化效果，具体透明化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。通常细胞球较大时，透明化时间需要适当延长。

5. (选做)细胞核染色。

去除50% BeyoCUBIC™ 3D Solution，每孔加入100µl 1X Wash Buffer清洗细胞2次。使用Beyo3D™ DAPI染色液(C1341)或Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(C1345)进行细胞核染色。

6. (选做)免疫荧光染色。

a. 一抗孵育。用免疫染色一抗稀释液(P0103)、QuickBlock™免疫染色一抗稀释液(P0262)或其它适当的一抗稀释液按照一抗推荐的稀释比例进行稀释。37°C或室温摇床(60rpm)适当避光孵育1小时。如果一抗孵育1小时效果不佳，可4°C缓慢摇动孵育过夜。

注：一抗稀释比例及孵育时间可以根据实际染色效果进行适当调整。

b. 回收一抗，每孔加入100µl 1X Wash Buffer，室温洗涤至少3次。

c. 二抗孵育。用免疫荧光染色二抗稀释液(P0108)、QuickBlock™免疫荧光染色二抗稀释液(P0265)或其它适当的二抗稀释液按照二抗推荐的稀释比例进行稀释。37°C或室温摇床(60rpm)避光孵育1小时。

注：二抗稀释比例及孵育时间可以根据实际染色效果进行适当调整。

d. 回收二抗。

7. 荧光拍摄。

染色结束后，每孔加入100µl 1X Wash Buffer清洗细胞2次并换液，随后即可在荧光显微镜下观察。

常见问题：

1. 3D细胞透明化过程中是否需要使用特殊类型的容器？

无须使用特殊类型的容器。可以使用实验室常用的聚丙烯或聚乙烯类塑料器皿或玻璃器皿。

2. 3D细胞在透明化过程中会膨胀吗？膨胀对实验有什么负面影响吗？

3D细胞在透明化过程中很可能会膨胀。但这种膨胀是接近线性并且比较微弱均匀的，细胞相对位置是保持不变的。除了整体形态会微膨胀外，其它不会产生很明显的负面影响。

3. 可以跳过固定步骤直接进行透明化吗？

不可以。在未进行固定的情况下进行3D细胞透明化，可能导致细胞相对位置紊乱，也可能影响后续免疫染色等的效果。因此，在透明化之前需要先固定样本。

4. 透明化的3D样品可以使用什么样的细胞核荧光染料？

推荐使用Beyo3D™ DAPI染色液(C1341)或Beyo3D™ Hoechst 33342染色液(C1345)等。

5. 是否需要购买特殊的抗体用于透明化处理后的样品？

虽然许多蛋白质在固定、脂肪清除和脱色过程中不会失去其抗原性，但也有例外。建议最好对所使用的抗体进行适当验证。

6. 可以使用荧光标记的二抗吗？

可以。但考虑到样品中每个抗体孵育所需的时间，如能使用荧光标记一抗效果更佳。

7. 可以兼容哪些荧光蛋白？

本试剂盒具有较好的荧光蛋白兼容性，可以兼容GFP、EGFP、EYFP、mCherry和mKate2等常见荧光蛋白。

8. 可以使用什么样的荧光染料？

FITC、Rhodamine、Cy3、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647等常见荧光探针都是可以使用。

参考文献：

- Hasegawa S, Susaki E, Tanaka T, Komaba H, Wada T, et al. 2019. 96(1):129-138.
- Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybył a W, Zajączkowska M, Teresiak A, et al. Arch Med Sci. 2018. 14(4):910-919.
- Riedl A, Schleder M, Pudielko K, Stadler M, Walter S, et al. J Cell Sci. 2017. 130(1):203-218.
- Hoarau-Véhot J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Int J Mol Sci. 2018. 19(1):181.
- Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. J Cell Physiol. 2015. 230(1):16-26.
- 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
P0121	BeyoCUBIC™ 3D细胞透明化试剂盒	5/25ml
C1341	Beyo3D™ DAPI染色液	10/50/200ml
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
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
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	BeyoGold™超低吸附35mm培养皿	10/40个
FULA060	BeyoGold™超低吸附60mm培养皿	10/40个
FULA100	BeyoGold™超低吸附100mm培养皿	10/40个

Version 2025.04.30