

bioGenous LivingCell-Fluo™ Organoid Vitality Assay Kit （类器官活细胞活性分析试剂盒）

货号：E238004

一、产品描述

bioGenous LivingCell-Fluo™ Organoid Vitality Assay Kit（LivingCell-Fluo™）提供了一种利用荧光检测方法分析多孔培养板中的细胞和类器官活力的方案。它是通过检测细胞代谢能力来评价细胞活力，活细胞可以将试剂盒中的荧光染料还原为红色强荧光的产物（激发波长：560 nm；发射波长：590 nm）；而非活细胞会迅速失去代谢能力，无法还原荧光染料，因此不会产生荧光信号。为了确保检测过程中类器官的活性，在该试剂盒中还包含了类器官专用的活力检测 Buffer。此外，该试剂盒还可以与伯桢智造™活细胞活性分析系统（LivingCell Vitality Analysis System）配套使用，以便科研人员可以简捷快速地检测类器官活力。

二、产品特点

LivingCell-Fluo™的特点包括：（1）无需消化、裂解细胞及类器官，即用型，操作便捷；（2）高度敏感的线性响应，最短检测时间 30 min，每孔最少可检测 100 个细胞；（3）方便的添加和读取模式，检测前后无需洗涤；（4）荧光染料无毒无菌，且不影响细胞正常代谢及基因表达，可对细胞或类器官进行多次活性分析，有利于连续监测及深入研究哺乳动物细胞及类器官生长状态。（5）基于荧光法的原理，无需使用黑色透明底的细胞培养孔板，节约实验耗材费用；（6）类器官专用活力检测 Buffer，可确保类器官在活性检测过程中维持稳定的状态，提高实验数据可靠性。（7）可通过多次检测校准实验过程中人为铺板误差导致的数据偏差。

三、产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
bioGenous LivingCell-Fluo™ Organoid Vitality Assay Kit	E238004	10 mL/50 mL (1000/5000 次)	4 °C, 1 年 -20 °C, 2 年
组份 A: 活细胞荧光染料 (10X)	-	10 mL/50 mL	4 °C, 1 年 -20 °C, 2 年
组份 B: 类器官活力检测 Buffer	-	100 mL/500 mL	4 °C, 1 年 -20 °C, 2 年

四、检测原理

本试剂盒中含有活细胞荧光染料和类器官活性分析专用 Buffer，配置好检测液后，将其加入培养细胞/类器官的体系中检测荧光信号。检测试剂无需裂解细胞，荧光染料可自由进出活细胞，并与活细胞中的代谢还原酶反应产生荧光信号，信号的强度与体系中的活细胞数量成正比。



图 1. 检测原理示意图

五、保存及运输条件

密封避光，4 °C 保存 1 年，-20 °C 长期保存 2 年，冰袋运输；

六、实验步骤

6.1 实验仪器及耗材准备

单通道/多通道移液器、3D 微组织培养多孔板、荧光酶标仪或伯桢智造™活细胞活性分析系统（LivingCell Vitality Analysis System）。

6.2 实验试剂准备

1) 配置 1×类器官活力检测工作液：取组份 B（类器官活力检测 Buffer）将组份 A（活细胞荧光染料，10×）稀释为 1×，即为 1×类器官活力检测工作液。以检测 96 孔板整板为例，待检测孔为 96 个，每孔需要 100 μL 1×类器官活力检测工作液，总共需要 9.6 mL 1×检测工作液；以配置 10 mL 检测工作液为例，需要将 9 mL 组份 B 与 1 mL 组份 A 混合，混合均匀后在 120 min 之内添加并检测。

注意：本产品保存温度为 4 °C 时，有效期为 1 年；保存温度为-20 °C 时，有效期为 2 年；为了避免反复冻融，产品第一次使用时，可按照每次使用量的 3-5 倍体积进行分装；另外，组份 A 为荧光染料，如分装需避光保存。

2) 使用前轻柔颠倒几次混匀检测工作液。

3) 如检测 2D 细胞活力则使用细胞完全培养基稀释活细胞荧光染料（组份 A）即可；推荐 96 孔板检测，如检测其他类型孔板，每孔所需工作液及各组份体积参考以下表格：

孔板类型	所需 1X 类器官活力检测工作液体积 (μL)	所需组份 A 体积 (μL)	所需组份 B/细胞完全培养基体积 (μL)
6 孔板	2000	200	1800
12 孔板	1000	100	900
24 孔板	500	50	450
48 孔板	200	20	180
96 孔板	100	10	90
384 孔板	40	4	36

6.3 以 96 孔板连续检测类器官活力为例，实验操作流程如下：

- 1) 从培养箱中取出待检测 96 孔细胞培养板，并尽可能地弃干净待检测孔中的原有完全培养液 (**a.避免进一步稀释染料; b.避免类器官培养过程代谢产生的物质残留影响染料; c.避免类器官完全培养基中的部分组份影响染料**)。
- 2) 向 96 孔板待检测孔中沿着侧壁每孔缓缓加入 100 μ L 1 \times 类器官活力检测工作液，设置无类器官的孔作为染料阴性对照，放入培养箱孵育 30-120 min，当培养孔中有细胞或类器官的工作液颜色由蓝色变成粉红色时（如检测细胞量较少，孵育 30-120 min 结束后工作液颜色可能由肉眼可见还是蓝色，因为染料是基于荧光信号的检测，工作液颜色未变为肉眼可见的粉红色并不影响检测结果），可进行下一步。
- 3) 使用荧光酶标仪（激发 Ex/发射 Em 波长：**560(\pm 10)_{Ex}/590(\pm 10)_{Em}**）或伯桢智造™活细胞活性分析系统（LivingCell Vitality Analysis System）进行检测，记录总荧光强度值。注意： \pm 10 代表检测 Ex（560nm）/Em（590nm）上下各 10nm 的波段范围。
- 4) 检测结束后弃去 96 孔板中液体，重新加入新鲜的完全培养基，继续培养 2 天。
- 5) 重复 1)、2)、3) 检测步骤，一般来说，正常生长状态的类器官的细胞活力应该随着培养时间延长而持续增加，以检测的总荧光值为例，每 2 天总荧光值应增加 20% 以上。
- 6) 根据总荧光强度值（扣除染料阴性对照）分析类器官的相对活力。

6.4 以 96 孔板类器官药物敏感性实验为例，实验操作流程如下：

- 1) 类器官传代消化成单细胞，以 96 孔板每孔（3-5 μ L 基质胶）铺板 3000 细胞为例，培养 2 天，使单细胞重新形成类器官。在加药前，可使用 LivingCell-Fluo™ 检测各孔类器官活力值以校准铺板误差（选做）：
 - a) 从培养箱中取出待检测 96 孔细胞培养板，弃去待检测孔中的原有完全培养基。
 - b) 向 96 孔板待检测孔中沿着侧壁每孔缓缓加入 100 μ L 1 \times 类器官活力检测工作液，设置无类器官的孔作为染料阴性对照组，放入培养箱孵育 30-120 min，当培养孔中有细胞或类器官的工作液颜色由蓝色变成粉红色时（如检测细胞量较少，孵育 30-120 min 结束后工作液颜色可能由肉眼可见还是蓝色，因为染料是基于荧光信号的检测，工作液颜色未变为肉眼可见的粉红色并不影响检测结果），可进行下一步。
 - c) 使用荧光酶标仪（激发/发射波长：**560(\pm 10)_{Ex}/590(\pm 10)_{Em}**）或伯桢智造™活细胞活性分析系统（LivingCell Vitality Analysis System）进行检测，记录总荧光强度值。
- 2) 检测结束后弃去 96 孔板中液体，进行不同药物浓度的加药（提前用类器官完全培养基进行不同浓度的药物配置，并设置药物阴性对照组，每组 3 个以上复孔），继续培养，在加药作用 3-5 天后，使用 LivingCell-Fluo™ 检测各孔类器官活力值：
 - 3) 重复 a)、b)、c) 检测步骤，其中加药作用后检测的孵育时间保证和加药前检测的孵育时间一致。
 - 4) 根据总荧光强度值（扣除染料和药物的阴性对照）分析类器官的相对活力。
 - 5) 药敏实验中各孔类器官的相对活力（校准铺板误差）计算公式为：

$$\text{Cell Viability (of Control, \%)} = \frac{\frac{(Ox_{A2} - \overline{NC}_{A2})}{(Ox_{A1} - \overline{NC}_{A1})}}{\sum_{i=0}^n \left[\frac{(VC_{A2} - \overline{NC}_{A2})}{(VC_{A1} - \overline{NC}_{A1})} \right] / n} \times 100\%$$

公式中 n (n ≥ 3) 代表：药敏实验复孔数目；A1 代表：加药前检测；A2 代表：加药作用后检测；Ox 代表：不同药物浓度处理组；NC 代表：染料阴性对照组；VC 代表：药物阴性对照组； \overline{NC}_{A2} 代表加药作用后染料阴性对照组的平均值； \overline{NC}_{A1} 代表加药前染料阴性对照组的平均值。

6) 如只在加药作用后用 LivingCell-Fluo™ 检测，类器官活力计算公式为：

$$\text{Cell Viability (of Control, \%)} = \frac{Ox - \overline{NC}}{\overline{VC} - \overline{NC}} \times 100\%$$

公式中 Ox 代表：不同药物浓度处理组；NC 代表：染料阴性对照组；VC 代表：药物阴性对照组； \overline{NC} 代表染料阴性对照组的平均值； \overline{VC} 代表药物阴性对照组的平均值。

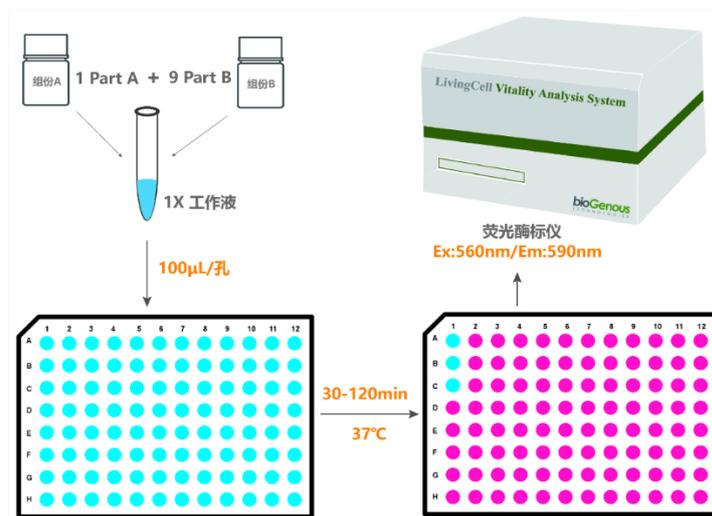


图 2. 实验操作流程示意图

七、注意事项：

7.1 合适密度的细胞可以增加试剂检测灵敏度。对于 96 孔板，我们建议每孔接种大于 100 个细胞，小于 100000 个细胞。

7.2 整个检测过程需要避免阳光直射（实验室白光灯影响较小），并为无菌操作，因为微生物污染会影响实验结果。

7.3 加入检测试剂后的孵育时间与细胞浓度相关，细胞浓度过低推荐适当延长孵育时间，细胞浓度过高推荐缩短孵育时间。推荐荧光酶标仪从底部检测，因为孔板盖上水汽和孔正上方马克笔标记会严重影响检测值。

7.4 计算活力值时应该扣除阴性对照（无细胞/类器官的孔），如进行药敏实验还需设置并扣除药物对照。

八、应用案例：

- 8.1、使用 LivingCell-Fluo™ 分析不同细胞数目肺腺癌类器官（LAC）的活力，细胞活力如图 3A；
- 8.2、使用 LivingCell-Fluo™ 对 LAC 和人小肠类器官（HIO）进行连续生长检测，一般来说，正常生长状态的类器官的细胞活力应该随着培养时间延长而持续增加，以检测的总荧光值为例，每 2 天总荧光值应增加 20% 以上，如图 3B 所示；
- 8.3、使用 LivingCell-Fluo™ 和 bioGenous ATP 试剂盒（货号：E238003）进行乳腺癌类器官对紫杉醇的药物敏感性实验，药敏曲线如图 3C 所示，LivingCell-Fluo™ 展现了和 ATP 法相当的药敏实验结果（对比 IC50 及药敏曲线拟合）；
- 8.4、使用 LivingCell-Fluo™ 检测不同细胞数目 CHO 细胞系接种在 Matrigel 中的 3D 细胞活力，细胞活力如图 3D 所示，LivingCell-Fluo™ 展示了高度敏感的线性响应。
- 8.5、使用 LivingCell-Fluo™ 和 CCK-8 分别检测不同细胞数目的 3D 人小肠类器官（HIO）活力（相同实验参数），结果显示：在 CCK-8 检测中，细胞数目在 50-100-150-200-250-300 时，与吸收光信号不成线性关系，并且在细胞数目为 250 时还出现了细胞数目多而吸光值明显小的现象，表明 CCK-8 灵敏度较低、稳定性较差；而在 LivingCell-Fluo™ 检测中，细胞数目和荧光信号成良好的线性关系，对比 CCK-8，LivingCell-Fluo™ 展现较高的灵敏度和稳定性（如图 4）。
- 8.6、使用 LivingCell-Fluo™ 和 CCK-8 分别检测 2D 细胞（293T 和 3T3 细胞系）活力（相同实验参数），结果显示：CCK-8 检测中，细胞数目在 50-2000 时，与吸收光信号不成线性关系，并且在细胞数目为 2000 时还出现了细胞数目多而吸光值明显小的现象，表明 CCK-8 灵敏度较低、稳定性较差。LivingCell-Fluo™ 检测中，随着细胞数目的增加，荧光信号强度也逐渐增强，对比 CCK-8 检测 2D 细胞系活力，LivingCell-Fluo™ 展现较高的灵敏度和稳定性（如图 4）。

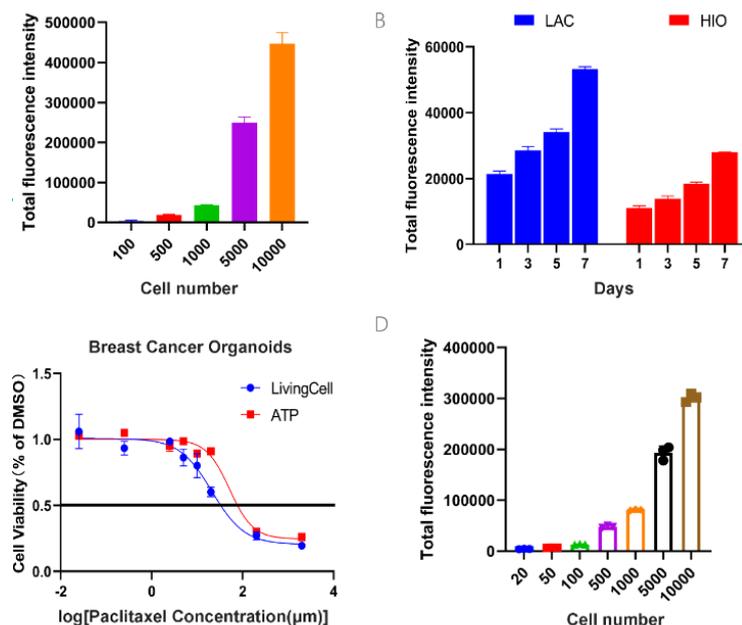


图 3 LivingCell-Fluo™ 检测 3D 细胞活力

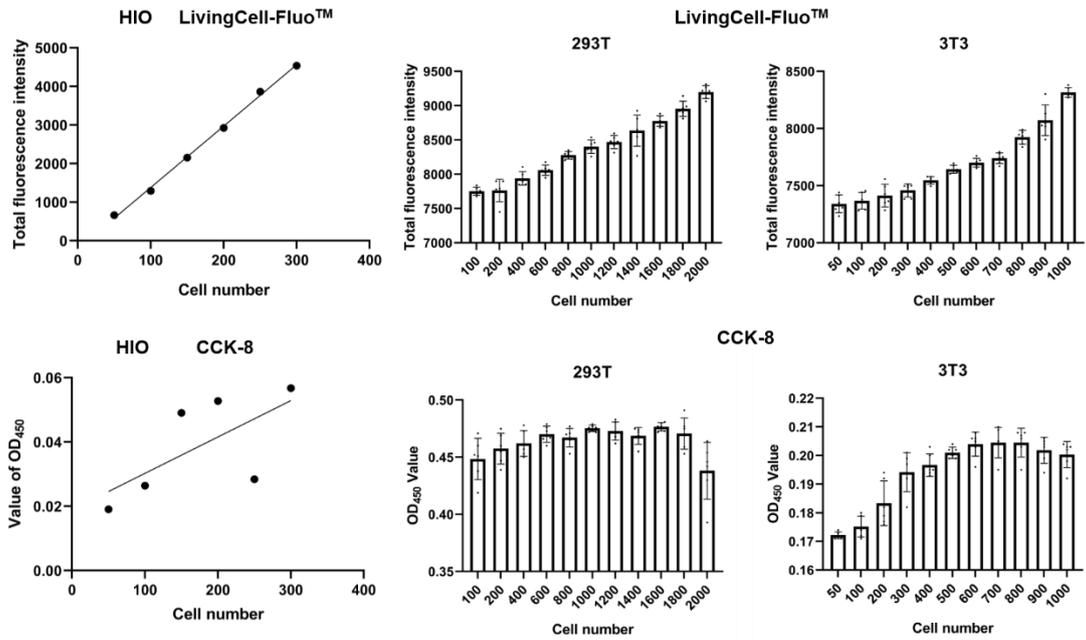


图 4 LivingCell-Fluo™ 与 CCK8 对比检测 3D 人小肠类器官和 2D 细胞系（293T 和 3T3）活力

修订日期：2023.09.28