

SuperView™ 488 Caspase-3 Assay Kit for Live Cells

SuperView™ 488 Caspase-3 活细胞分析试剂盒

产品信息

产品名称	产品编号	规格
SuperView™ 488 Caspase-3 Assay Kit for Live Cells	40273ES25	25 T
SuperView™ 488 Caspase-3 活细胞分析试剂盒	40273ES60	100 T

产品描述

活细胞分析试剂盒包含 SuperView 488 Caspase-3 底物和 Ac-DEVD-CHO Caspase-3/7 抑制剂。SuperView 488 Caspase-3 Substrate 为基于 Caspase-3/7 活力检测细胞凋亡提供了有效的工具，适用于荧光显微观察和流式细胞仪分析。

相较于其它基于 (FLICA) 分析的 Caspase 的荧光底物或荧光抑制，试剂盒内提供的 Substrate 检测 Caspase-3/7 活性的同时不会抑制完整细胞的凋亡过程。Substrate 由耦合 Caspase-3/7 DEVD 识别序列的荧光 DNA 染料组成。Substrate 最初无荧光，其会穿过细胞膜进入细胞质。在凋亡细胞中 Caspase-3/7 剪切 Substrate 释放高亲和性的 DNA 染料，这种染料迁移到细胞核标记 DNA 并发出明亮的绿色荧光。Substrate 是双功能的，既可以检测 Caspase-3/7 活性，又能可视化细胞核在细胞凋亡进行中的形态学变化。SuperView 染色可以进行甲醛固定并兼容后续免疫染色实验。

光谱特性 SuperView : Ex/Em=500/530 nm (with DNA)

产品组分

编号	组分名称	产品编号/规格	
		40273ES25 (25 T)	40273ES60 (100 T)
40273-A	SuperView 488 Caspase-3 Substrate, 0.2 mM in DMSO	125 µL	500 µL
40273-B	Caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO, 2 mM in DMSO	20 µL	100 µL

运输与保存方法

冰袋 (wet ice) 运输。储存于 4°C，至少可以储存 12 个月。

注意事项

- 1、细胞可用 Hoechst 33342 染料 (推荐浓度 1 µM) 共染，使细胞核产生蓝色荧光染色 (Ex/Em=346/460 nm)。
- 2、SuperView 488 染料可用甲醛固定，但与甲醇固定不兼容。
- 3、经甲醛固定的 SuperView 488 染色细胞可用 0.1% TritonX-100 处理后行后续染色，但这样处理后的染色亮度可能会减弱。
- 4、操作时请采取防护措施，穿防护服、戴一次性手套等。
- 5、本产品仅作科研用途！

使用方法

1. 实验优化

下面提供的实验步骤根据终点法检测制度。SuperView 488 Substrate 可进行细胞长时间孵育过程研究。细胞密度、底物浓度和抑制剂浓度可能需要优化。推荐底物浓度 1-10 µM 之间。细胞可在培养基、PBS 或其他的缓冲液中孵育底物。对于贴壁细胞，建议更换新鲜含有底物的培养基，以防背景的不均一性。底物孵育后换液或洗涤细胞等操作可自由选择。

2. 对照设定

推荐设定以下对照:

- A. 阴性对照: 不诱导凋亡的细胞
- B. 阳性对照: 诱导凋亡的细胞
- C. 抑制剂对照: 诱导细胞凋亡同时 (或提前 10-30 min) 孵育 Caspase-3/7 抑制剂, 最后再添加 SuperView 488 Caspase-3 底物。

3. 抑制剂对照

试剂盒中所提供的 Caspase-3/7 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 可用来确认 Caspase-3/7 依赖于 SuperView 488 的荧光信号。对于抑制剂对照, 抑制剂的终浓度应至少是底物浓度的 2 倍 (例如当使用 5 μ M SuperView 488 底物时, Ac-DEVD-CHO 浓度为 10 μ M)。添加底物前在室温下孵育 Ac-DEVD-CHO 15-30 min, 加入底物后, 孵育液中继续保留抑制剂。Ac-DEVD-CHO 是可逆的竞争性抑制剂。对于某些细胞类型有效的 Caspase-3/7 抑制剂需要使用不可逆的抑制剂, 如 Z-DEVD-FMK, 或需要在凋亡诱导之前或诱导过程中添加抑制剂。

4. 流式细胞仪分析

- 4.1 选择合适的方法诱导细胞凋亡, 未经处理的细胞样本作为对照。
- 4.2 对于贴壁细胞, 实验前先用胰蛋白酶或其他方法消化细胞。
- 4.3 用细胞培养基或合适缓冲液重悬细胞, 使细胞密度达到 10^6 个/mL 数量级。
- 4.4 添加 200 μ L 细胞悬液至流式细胞试管。
- 4.5 抑制剂对照样本, 用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞 (见上文)。
- 4.6 200 μ L 细胞悬液中加入 5 μ L 0.2 mM 的 Substrate 并立即混匀使底物浓度为 5 μ M。不同类型细胞最佳底物浓度可能不同, 需进一步优化。
- 4.7 室温避光孵育 15-30 min。
- 4.8 加入 300 μ L 细胞培养基或 PBS, 使用流式细胞仪分析, 选择检测绿色荧光的通道 (激发/发射: 485/515 nm)。

5. 荧光显微镜观察

- 5.1 选择合适的方法诱导细胞凋亡, 未经处理的细胞样本作为对照。
- 5.2 抑制剂对照样本, 用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞 (见上文)。
- 5.3 用含 5 μ M Substrate 的新鲜培养基或 PBS 对细胞进行换液 (见试验优化)。对于抑制剂对照组, 抑制剂与底物一同孵育。
- 5.4 室温孵育 30 min 或更长时间。
- 5.5 PBS 或其它缓存液清洗细胞, 荧光显微镜观察细胞, 使用观察绿色荧光的滤片 (激发/发射: 485/515 nm)。

6. 荧光酶标仪检测

- 6.1 将贴壁细胞生长在黑色 96 孔板中; 对于悬浮细胞, 调整密度至 10^6 个/mL, 每孔加入 0.2 mL 细胞悬液。
- 6.2 选择合适的方法诱导细胞凋亡, 未经处理的细胞样本作为对照。(注意: 细胞可能在管或瓶中处理, 然后转移到 96 孔检测板。)
- 6.3 抑制剂对照样本, 用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞 (见上文)。
- 6.4 对于悬浮细胞, 直接添加 Substrate 混匀。对于贴壁细胞, 用含有 5 μ M Substrate 的新鲜培养基或 PBS 对细胞进行换液 (见试验优化)。对于抑制剂对照组, 抑制剂与底物一同孵育。
- 6.5 细胞可以在含有 Substrate 的培养基中直接观察。
- 6.6 对于悬浮细胞, 轻轻震荡重悬细胞。荧光酶标仪设置激发波长 488 nm 和发射波长 520 nm。建议贴壁细胞使用底部阅读方式。贴壁细胞密度的变化可能导致不准确的读数。