

产品说明书

产品名称: SuperView™ 488 Caspase-3 Assay Kit for Live Cells

产品货号: BN16007

产品规格: 25T, 100T

产品内容:

组分	25T	100T
A. SuperView 488 Caspase-3 Substrate, 0.2 mM in DMSO	125 μ L	500 μ L
B. Caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO, 2 mM in DMSO	20 μ L	100 μ L

储存条件

储存于 4°C, 其中 A 组分需避光, 本产品在推荐条件下可以储存 6 个月。

光谱特性

SuperView 488: Abs/Em = 500/530 nm (with DNA)

产品介绍

SuperView 488 Caspase-3 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, 适用于荧光显微术和流式细胞术。

相比其他基于 (FLICA) 分析的 Caspase 的荧光底物或荧光抑制剂, SuperView 488 Caspase-3 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, 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 染色, 这种染料迁移到细胞核标记 DNA 并发出明亮的绿色荧光。因此, SuperView 488 Caspase-3 Substrate 是双功能的, 既可以检测 Caspase-3/7 活性, 又可可视化细胞核在细胞凋亡进行中的形态学变化。SuperView 488 染色

可以甲醛固定并兼容后续免疫染色实验。

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 也可以进行细胞长时间孵育课程研究 (见下一页常见问题)。细胞密度、底物浓度和抑制剂浓度可能需要优化。最佳底物浓度可能在 1-10 μ M 之间。细胞可以在培养基、PBS 或其他您所选择的缓冲液中孵育底物。对于贴壁细胞, 我们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的操作是自由选择的。

2. 对照

我们建议您设定以下对照:

- 阴性对照: 不诱导凋亡的细胞
- 阳性对照: 诱导凋亡的细胞
- 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. Ac-DEVD-CHO Caspase-3 抑制剂对照

试剂盒中的 Caspase-3/7 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 可以用来确认 Caspase-3/7 依赖于 SuperView 488 的荧光信号。对于抑制剂对照, 抑制剂的终浓度应该至少是底物浓度的 2

倍（例如当使用 5 μM SuperView 488 底物时，Ac-DEVD-CHO 浓度为 10 μM ）。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。在某些细胞类型，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. 流式细胞术

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 贴壁细胞，执行 SuperView 488 Caspase-3 实验前先用胰蛋白酶或其他方法消化细胞。

4.3 用培养基或缓冲液重悬细胞，使细胞密度为 10^6 个/mL

4.4 吸取 0.2 mL 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 μL 细胞悬液中加入 5 μL 0.2 mM 的 Substrate 并立即混匀使底物浓度为 5 μM 。不同细胞的最佳底物浓度可能不同，需分析优化。

4.7 室温避光孵育细胞 15-30 min。

4.8 加入 300 μL 培养基或 PBS，流式细胞仪分析。检测绿色荧光的通道（激发/发射：485/515 nm）。

5. 荧光显微术

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 用含有 5 μM 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 室温下孵育细胞 30 min 或更长时间。

6. 荧光酶标仪

6.1 贴壁细胞生长在黑色 96 孔板中；悬浮细胞，调整密至 10^6 个/mL，0.2 mL 细胞悬液分装到一孔。

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 μM 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。对于终点分析法，PBS 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）。

6.6 对于悬浮细胞，轻轻摇晃重悬细胞。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建议贴壁细胞。贴壁细胞密度的变化可能导致不准确的读数。

7. 注意事项

7.1 细胞可以用终浓度为 1 μM 的 Hoechst 33342 染料共同染色，使细胞核产生蓝色荧光染色（激发/发射:346/460 nm）。

7.2 SuperView 488 染色可以被甲醛固定，但与甲醇固定不兼容。

7.3 甲醛固定的 SuperView 488 染色细胞可以用 0.1% TritonX-100 处理后进行后续染色，但这样处理后的染色的亮度可能会减弱。

基本问题及解答

问题	回答
SuperView 488 Caspase-3 Substrate 稳定性如何?	该物质稳定性很好, 用户反馈该产品 37°C 放置 4-5 天, 效果仍然很好
何时将 SuperView 488 Caspase-3 Substrate 加入细胞中?	该物质实验前期、后期加入细胞均可, 它不影响细胞凋亡进程, 可实时监测 Caspase-3 活性
SuperView 488 Caspase-3 Substrate 适用于哪种仪器检测?	该产品适用于能够激发并收集绿色荧光的仪器
SuperView 488 Caspase-3 Substrate 可用于组织染色吗?	本公司未作 SuperView Substrates 活组织染色实验, 有文献报道可用于胚胎组织或三维培养细胞, 本产品不可用于固定细胞或组织
SuperView 488 Caspase-3 Substrat 可用于随后的免疫染色吗?	可以, 推荐使用 2-4% 的多聚甲醛室温固定 10-15min, 固定时间过长会导致信号下降, SuperView 488 可以承受 0.1% 的 TritonX-100 的通透性。不建议使用甲醇固定
显微镜下 SuperView 488 Caspase-3 Substrat 显色可维持多长时间?	荧光染料均存在荧光猝灭问题, 该产品在荧光显微镜下保持稳定的时间与初始荧光强度、激发光源强度等因素有关
为什么 Ac-DEVD-CHO 不能抑制 SuperView 进行细胞染色?	Ac-DEVD-CHO 是一种可逆的竞争性抑制剂, 具有有限的细胞渗透性, 可能不足以阻止高水平的 Caspase-3 活性。我们的实验表明, 抑制剂的存在能够降低而不能消除整体的荧光强度, 而不可逆抑制剂能够更有效地阻止 Caspase 活性。
SuperView Caspase-3 Substrate 的特异性如何?	与其它 Caspase-3 底物相似, SuperView Caspase-3 Substrate 是基于能被 Caspase-7 切割的 DEVD Caspase-3 共同序列, 其它的半胱天冬酶也可能因与底物特异性序列重叠而切割 DEVD 底物
SuperView Caspase-3 Substrate 适用于哪些细胞?	SuperView Caspase-3 Substrate 已被报道用于多种原代细胞和科研文献中的永生化细胞中