

# 产 品 说 明 书

## SuperView™ 488 Caspase-3 活细胞分析试剂盒

产品货号: S6007S, S6007L

产品规格: 25T, 100T

产品内容:

| 组分                                                   | S6007S (25T) | S6007L (100T) |
|------------------------------------------------------|--------------|---------------|
| A. SuperView 488 Caspase-3 Substrate, 0.2 mM in DMSO | 125 $\mu$ L  | 500 $\mu$ L   |
| B. Caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO, 2 mM in DMSO     | 20 $\mu$ L   | 100 $\mu$ L   |

## 储存条件

储存于 4°C, 其中 A 组分需避光, 有效期见外包装。

## 光谱特性

SuperView 488: Ex/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 抑制剂。SuperView 488 Caspase-3 Substrate 为基于 Caspase-3 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 活性的同时不会抑制完整细胞的凋亡过程。

Substrate 由耦合 Caspase-3 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 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 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。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  $\mu$ 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:



- 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. 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  $\mu$ M SuperView 488 底物时，Ac-DEVD-CHO 浓度为 10  $\mu$ 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。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

- (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。
- (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。
- (3) 用培养基或缓冲液重悬细胞，使细胞密度为  $10^6$  个/mL
- (4) 吸取 0.2 mL 细胞悬液至流式细胞试管。
- (5) 抑制剂对照样本，用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞（见上文 3. Ac-DEVD-CHO Caspase-3 抑制剂对照）。
- (6) 200  $\mu$ L 细胞悬液中加入 5  $\mu$ L 0.2 mM 的 Substrate 并立即混匀使底物浓度为 5  $\mu$ M。不同细胞的最佳底物浓度可能不同，需分析优化。
- (7) 室温避光孵育细胞 15-30 min。
- (8) 加入 300  $\mu$ L 培养基或 PBS，流式细胞仪分析。检测绿色荧光的通道（Ex/Em = 485/515 nm）。

### 5. 荧光显微镜

- (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。
- (2) 抑制剂对照样本，用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞（见上文 3. Ac-DEVD-CHO Caspase-3 抑制剂对照）。
- (3) 用含有 5  $\mu$ M Substrate 的新鲜培养基或 PBS 对细胞进行换液（见上文 1. 实验优化）。对于抑制剂对照组，抑制剂与底物一同孵育。
- (4) 室温下孵育细胞 30 min 或更长时间。
- (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（Ex/Em = 485/515 nm）。

### 6. 荧光酶标仪

- (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。
- (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：细胞可能在管或瓶中处理，然后转移到 96 孔检测板。

- (3) 抑制剂对照样本，用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞（见上文 3. Ac-DEVD-CHO Caspase-3 抑制剂对照）。
- (4) 对于悬浮细胞，直接添加 Substrate 混匀。对于贴壁细胞，用含有 5  $\mu$ M Substrate 的新鲜培养基或 PBS 对细胞进行换液（见上文 1. 实验优化）。对于抑制剂对照组，抑制剂与底物一同孵育。



(5) 细胞可以在含有 Substrate 的培养基中直接观察。

(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采集方式。贴壁细胞密度的变化可能导致不准确的读数。

## 注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
2. 细胞可以用终浓度为 1  $\mu$ M 的 Hoechst 33342 染料共同染色，使细胞核产生蓝色荧光染色（Ex/Em = 346/460 nm）。
3. SuperView 488 染色可以被甲醛固定，但与甲醇固定不兼容。
4. 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，但处理后的染色的亮度可能会减弱。
5. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

