

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01083

产品介绍

ApopView 488 Caspase-3 底物 (1 mM in DMSO, 绿色) 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, ApopView 488 Caspase-3 底物 (1 mM in DMSO, 绿色) 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, ApopView 488 Caspase-3 底物 (1 mM in DMSO, 绿色) 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。

ApopView 488 Caspase-3 底物 (1 mM in DMSO, 绿色) 提供 DMSO 和 PBS 两种溶解形式。PBS 形式可用于对 DMSO 毒性敏感的细胞, 在对 DMSO 不敏感的细胞类型中, 添加 DMSO 溶解形式可增强、ApopView 488 的孵育染色效果。

应用范围

细胞凋亡检测

储运条件

-20 °C 避光干燥保存, 有效期见外包装; 冰袋运输。

产品特点

稳定性好: 荧光亮度高且抗淬灭性好;

批间差小: 产品为公司自研, 批间差控制的好。

产品参数

Ex/Em: 500/530 nm (with DNA)

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 μ 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.ApopView 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 ApopView 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.本产品仅限于科研, 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。
- 7.为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

1.耗材

1.5 mL 离心管

2.仪器

流式细胞仪

操作步骤

1.实验优化

下面提供的实验步骤根据终点法检测制度。ApopView 488 Caspase-3 底物 (1 mM in DMSO, 绿色) 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 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。

(1) 对照

我们建议您设定以下对照:

1) 阴性对照: 不诱导凋亡的细胞。

2) 阳性对照: 诱导凋亡的细胞。

3) 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 ApopView 488 Caspase-3 底物 (1 mM in DMSO, 绿色)。

(2) 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 ApopView 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 μ M ApopView 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。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。

(3) 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 ApopView 488 Caspase-3 底物 (1 mM in DMSO, 绿色) 实验前先用胰蛋白酶或其他方法消化细胞。

3) 冲液重悬细胞, 使细胞密度为 10⁶ 个/mL。

4) 取 0.2 mL 细胞悬液至流式细胞试管。

5) 对照样本, 用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞 (见上文 (2) Ac-DEVD-CHO Caspase-3 抑制剂对照)。

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 μ 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)。

(4) 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 (2) Ac-DEVD-CHO Caspase-3 抑制剂对照)。

3) 用含有 5 μ 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)。

(5) 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 10⁶ 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 (2) 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 μ 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。