产 品 说 明 书

SuperView 488 Caspase-3 活细胞分析试剂盒

产品货号：SB-S6007S/ S6007L

产品规格：25T, 100T

产品内容：

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

储存条件

储存于 4ºC，其中 A 组分需避光，有效期见外包装。

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 μM 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 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

（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）。

（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。

（7）室温避光孵育细胞 15-30 min。

（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

（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）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。

（4）室温下孵育细胞 30 min 或更长时间。

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。注意：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）。

（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。

（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）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。

注意事项

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）。

2. SuperView 488 染色可以被甲醛固定，但与甲醇固定不兼容。

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。

ShareBio 上海圣尔生物科技有限公司 021-34122580 www.share-bio.com 上海市闵行区剑川路 951 号 1 幢南区 615 室