

## Ready-to-use CaspTrace™488 Caspase-3/7 底物 (1 mM in DMSO)

### 1 产品基本信息

产品名称 (中文): Ready-to-use CaspTrace™488 Caspase-3/7 底物 (1 mM in DMSO)

产品名称 (英文): Ready-to-use CaspTrace™488 Caspase-3/7 Substrate (1 mM in DMSO)

产品编号: MX1417

### 2 规格或纯度

125 µL

### 3 产品介绍

产品简介

CaspTrace™488 Caspase-3/7 底物基于 caspase-3/7 活力检测细胞凋亡提供有效工具, 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 荧光底物或荧光抑制剂, 其检测 caspase-3/7 活性时不会抑制完整细胞的凋亡过程。

底物由耦合 caspase-3/7 DEVD 识别序列的荧光 DNA 染料组成, 最初无荧光, 可穿过细胞膜进入细胞质; 在凋亡细胞中, caspase-3/7 剪切底物, 释放高亲和性的 DNA 染色, 该染料迁移到细胞核标记 DNA 并发出明亮绿色荧光。因此, 该底物具有双功能, 既可检测 caspase-3/7 活性, 又能可视化细胞凋亡过程中细胞核的形态学变化, 且其染色可经甲醛固定, 兼容后续免疫染色实验。

CaspTrace™488 Caspase-3/7 底物提供 DMSO 和 PBS 两种溶解形式: PBS 形式可用于对 DMSO 毒性敏感的细胞, 对 DMSO 不敏感的细胞类型中, 添加 DMSO 溶解形式可增强孵育染色效果。

产品特点

- 稳定性好: 荧光亮度高且抗淬灭性好
- 批间差小: 批间差控制良好

适用范围:

细胞凋亡检测

### 4 储存与运输

储存条件: -20°C 避光干燥保存;

运输条件: 冰袋运输。

### 5 使用方法 (仅供参考)

本实验步骤基于终点法检测, CaspTrace™488 Caspase-3/7 底物也可用于细胞长时间孵育研究; 细胞密度、底物浓度和抑制剂浓度可能需优化, 最佳底物浓度可能在 1~10 µM 之间, 细胞可在培养基、PBS 或其他所选缓冲液中孵育底物; 对于贴壁细胞, 建议更换新鲜含底物的培养基以防背景不均一, 底物孵育后换液或洗涤细胞可自由选择。

#### (1) 对照

建议设定以下对照:

- 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, 最后添加 CaspTrace™488 Caspase-3/7 底物;

#### (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 可用于确认 Caspase-3/7 依赖于 CaspTrace™488 的荧光信号; 抑制剂终浓度应至少是底物浓度的 2 倍; 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, 某些细胞类型中, 有效的 Caspase-3/7 抑制剂需使用不可逆抑制剂 (如 Z-DEVD-FMK), 或需在凋亡诱导之前或诱导过程中添加抑制剂。

### (3) 流式细胞术

- 选择合适方法诱导细胞凋亡，以未经处理的细胞样本作为对照；
- 贴壁细胞需先用胰蛋白酶或其他方法消化细胞，再执行 CaspTrace™488 Caspase-3/7 实验
- 用缓冲液重悬细胞，使细胞密度为  $10^6$  个 /mL；
- 取 0.2 mL 细胞悬液至流式细胞试管；
- 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）；
- 200  $\mu$ L 细胞悬液中加入 5  $\mu$ L 0.2 mM 的底物并立即混匀，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；
- 室温避光孵育细胞 15~30 min；
- 加入 300  $\mu$ L 培养基或 PBS，用流式细胞仪分析，检测绿色荧光的通道（Ex/Em:485/515 nm）。

### (4) 荧光显微镜

- 选择合适方法诱导细胞凋亡，以未经处理的细胞样本作为对照；
- 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）；
- 用含有 5  $\mu$ M 底物的新鲜培养基或 PBS 对细胞换液（见上文 1. 实验优化）；抑制剂对照组中，抑制剂与底物一同孵育；
- 室温下孵育细胞 30 min 或更长时间；
- 细胞可在含有底物的培养基中直接观察；对于终点分析法，用 PBS 清洗细胞，用荧光显微镜观察，使用观察绿色荧光的滤片（Ex/Em:485/515 nm）。

### (5) 荧光酶标仪

- 贴壁细胞生长在黑色 96 孔板中；悬浮细胞调整密度至  $10^6$  个 /mL，取 0.2 mL 细胞悬液分装到一孔；
- 选择合适方法诱导细胞凋亡，以未经处理的细胞样本作为对照（注：细胞可在管或瓶中处理，再转移到 96 孔检测板）；
- 抑制剂对照样本用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞；
- 悬浮细胞直接添加底物混匀；贴壁细胞用含有 5  $\mu$ M 底物的新鲜培养基或 PBS 换液；抑制剂对照组中，抑制剂与底物一同孵育；
- 细胞可在含有底物的培养基中直接观察；
- 悬浮细胞轻轻摇晃重悬；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；贴壁细胞密度变化可能导致读数不准确。

## 6 常见问题 (FAQ)

### Q1: 产品稳定性如何？

答：该物质稳定性很好，用户反馈 37°C 放置 4~5 天，效果仍良好。

### Q2: 何时加入细胞中？

答：实验前期、后期加入细胞均可，不影响细胞凋亡进程，可实时监测 caspase-3 活性。

### Q3: 可用于组织染色吗？

答：本公司未进行活组织染色实验，有文献报道可用于胚胎组织或三维培养细胞。

### Q4: 可用于随后的免疫染色吗？

答：可以。推荐使用 2~4% 的多聚甲醛室温固定 10~15 min，固定时间过长会导致信号下降。

### Q5: 特异性如何？

答：与其它 caspase-3 底物相似，CaspTrace™488 底物基于能被 Caspase-7 切割的 DEVD caspase-3 共同序列，其它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。

### Q6: 适用于哪些细胞？

答: SuperView™ Caspase-3 底物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。

## 7 注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验;
- 细胞可用终浓度为 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);
- SuperView™ 488 染色可以被甲醛固定, 但与甲醇固定不兼容;
- 甲醛固定的 SuperView™ 488 染色细胞可用 0.1% TritonX-100 处理后进行后续染色, 但处理后染色亮度可能会减弱;
- 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;
- 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;
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。