

产 品 说 明 书

SuperView™ 488 Caspase-3底物, 1 mM in DMSO

产品货号: S1005

产品规格: 100 µL

光谱特性

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

储存条件

-20°C避光干燥保存, 有效期见外包装。

产品介绍

SuperView™ 488 Caspase-3 Substrate 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。

SuperView™ 488 Caspase-3 Substrate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、SuperView™ 488的孵育染色效果。

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研究(详见后“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。当在DMSO不敏感的细胞类型中使用S1006时, 添加DMSO可能会加强SuperView™ 488染色效果。

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

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, 进行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 /mL。
- (4) 吸取0.2 mL细胞悬液至流式细胞试管。
- (5) 往200 µL细胞悬液中加入1 µL 1 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。
- (6) 室温避光孵育细胞15-30 min。
- (7) 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)。

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) 用含有5 μ M Substrate 的新鲜培养基或PBS对细胞进行换液（见试验优化）。

(3) 室温下孵育细胞30 min或更长时间。

(4) 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）。

5. 荧光酶标仪

(1) 贴壁细胞在黑色96孔板中进行培养；悬浮细胞，调整密度至 10^6 cells/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：细胞可以在管或瓶中处理，然后转移到96孔检测板。

(3) 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

（见试验优化）。

(4) 室温避光孵育细胞15-30 min。

(5) 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. 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（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% Triton X-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。

常见问题

问题	回答
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。
可用于组织染色吗？	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。
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10-15 min，固定时间过长会导致信号下降。
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。
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细胞中。

