

产品说明书

产品名称: SuperView™ 488 Caspase-3 Substrate

产品货号: BN11005: 1 mM in DMSO

BN11006: 1 mM in PBS

产品规格: 100 μ L

储存条件

-20 °C避光干燥保存, 推荐条件下可储存6 个月。

光谱特性

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

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 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。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

- 3.1 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。
- 3.2 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。
- 3.3 用培养基或缓冲液重悬细胞, 使细胞密度为 10^6 /mL
- 3.4 吸取0.2 mL 细胞悬液至流式细胞试管。
- 3.5 往200 μ L细胞悬液中加入1 μ L 1 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。
- 3.6 室温避光孵育细胞15-30 min。

3.7 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 (激发/发射: 485/515 nm)。

4. 荧光显微镜

4.1 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。

4.2 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)。

4.3 室温下孵育细胞30 min 或更长时间。

4.4 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

5.1 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 细胞悬液到分装到一孔。

5.2 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。

5.3 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)。

5.4 室温避光孵育细胞15-30 min。

5.5 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。

6. 注意事项

6.1 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)。

6.2 SuperView™ 488 染色可以被甲醛固定, 但与甲醇固定不兼容。

6.3 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℃ 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化细胞中。