

riboAPO™ Caspase-3/7 细胞凋亡检测使用说明

RN: R11094.2

产品简介

半胱天冬氨酸酶（Caspase）的激活作为细胞凋亡的重要特征，在细胞程序性死亡的过程中起到了重要作用。本试剂盒采用带有荧光基团的 Caspase-3/7 特异性底物以检测细胞凋亡的程度。由于在细胞凋亡早期 Caspase-3/7 已被激活，故其特异性荧光底物能与 Caspase-3/7 不可逆结合，从而标记早期和晚期凋亡的细胞。本试剂盒与细胞凋亡晚期指示剂结合使用，可以对细胞的不同亚群（早期凋亡群、晚期凋亡群以及坏死群）进行分析。

本检测方法适用于荧光成像观察（推荐采用激光共聚焦设备，如激光共聚焦显微镜或高内涵分析仪）及流式细胞仪分析，与传统的 Annexin V/PI 或 TUNEL 等细胞凋亡检测方法相比，更加方便快速。

表 1 试剂盒组分清单

	试剂组成	浓度	C11061-1 100T	C11061-2 500T	C11061-3 2500T
试剂 A	Caspase-3/7 荧光底物	干粉	40 µg	200 µg	200 µg X 5
试剂 B	PI 染色液	100X	50 µL	250 µL	250 µL X 5
试剂 C	Hoechst 33342 染色液	100X	50 µL	250 µL	250 µL X 5
试剂 D	DMSO	-	20 µL	100 µL	100 µL X 5

注：使用次数以 96 孔板计算。

运输保存

产品为**低温运输**。

收到产品后，请于**-20℃**保存，可以稳定保存一年。

使用前请**瞬时离心**。其中【试剂 A】Caspase-3/7 荧光底物溶解于【试剂 D】DMSO 后，应进行分装保存于-20℃以下，避免反复冻融，其稳定期为 3 个月。

产品应用

早期和晚期细胞凋亡检测

实验方法

试剂准备

将全部【试剂 D】加入到【试剂 A】中配制成 250X 的【试剂 A 母液】，分装并保存于-20℃。

荧光成像染色

贴壁细胞（以96孔板为例）：

1. 接种约 $4\sim 5 \times 10^4$ 个细胞至含适量培养基的96孔板中，培养至细胞汇合度为40%-60%（如使用其它规格的细胞培养板，细胞接种量可等比放大）。
2. 待细胞贴壁后按照实验需求对其进行药物或条件处理。
3. 按照表2配制混合染色培养基。移除普通培养基，每孔加入50 μL 混合染色培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育45分钟（孵育时间可根据实验结果，在30-60分钟之间优化）。

表 2 贴壁细胞混合染色培养基配制参考用量

	每孔总体积	试剂 A 母液	试剂 C	新鲜培养基
96-well	50 μL	0.2 μL	0.5 μL	49.3 μL
24-well	200 μL	0.8 μL	2 μL	197.2 μL
12-well	400 μL	1.6 μL	4 μL	394.4 μL
6-well	800 μL	3.2 μL	8 μL	788.8 μL

4. 染色孵育期间，用新鲜培养基按100: 1的比例稀释【试剂B】，制备适量1X PI染色培养基。
注：1X PI染色培养基每孔用量请参考表2“每孔总体积”。
5. 孵育结束后，移除混合染色培养基，每孔加入50 μL 1X PI染色培养基，室温孵育2-5分钟。
6. 小心用PBS清洗两遍，并更换为新鲜培养基，用激光共聚焦显微镜/高内涵成像分析系统进行拍照分析。

表 3 荧光染料激发波长

荧光染料	最大激发波长	最大发射波长	类似光谱性质染料
Caspase-3/7 荧光信号	495 nm	519 nm	FAM
PI 染色液	538 nm	617 nm	7-AAD
Hoechst 33342	352 nm	455 nm	DAPI

悬浮细胞（以24孔板为例）：

1. 接种约 $1\sim 3 \times 10^5$ 个细胞至含有适量培养基的24孔细胞培养板中（如使用其它规格的细胞培养板，细胞接种量可等比放大）。
2. 根据实验需求对细胞进行药物或条件处理。
3. 收集细胞，300 g离心5分钟，弃上清。
4. 按照表4配制混合染色培养基。移除普通培养基，每孔加入100 μL 混合染色培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育45分钟（孵育时间可根据实验结果，在30-60分钟之间优化）。

表 4 悬浮细胞/流式细胞混合染色培养基配制参考用量

	每孔总体积	试剂 A 母液	试剂 C	新鲜培养基
24-well	100 μL	1 μL	1 μL	98 μL

12-well	200 μ L	2 μ L	2 μ L	196 μ L
6-well	400 μ L	4 μ L	4 μ L	392 μ L

5. 染色孵育期间，用新鲜培养基按100: 1的比例稀释【试剂B】，制备适量1X PI染色培养基。

注：1X PI染色培养基每孔用量请参考表4“每孔总体积”。

6. 混合染色培养基孵育结束后，300 g离心5分钟，弃去染色培养基。

7. 加入100 μ L 1X PI染色培养基，室温孵育2~5分钟。

8. 孵育结束后300 g离心5分钟，弃上清，用PBS清洗细胞1次，300 g离心5分钟，弃去PBS。

9. 用300 μ L新鲜培养基重悬细胞，将细胞悬液加入新的24孔板，待细胞沉降至板底，用激光共聚焦显微镜/高内涵成像分析系统进行拍照分析。

流式细胞染色

贴壁细胞（以24孔板为例，悬浮细胞实验方法与贴壁细胞类似）

1. 接种约 $1\sim 3 \times 10^5$ 个细胞至含适量培养基的24孔板中，培养至细胞汇合度为40%-60%（如使用其它规格的细胞培养板，细胞接种量可等比放大）。

2. 待细胞贴壁后按照实验需求对其进行药物或条件处理。

3. 用胰酶对细胞进行消化并用PBS清洗细胞1次，300 g离心5分钟，弃上清。

4. 参考表4配制混合染色培养基（【试剂C】无需添加，以新鲜培养基代替即可），每孔加入100 μ L混合染色培养基，37℃下孵育45分钟（孵育时间可根据实验结果，在30-60分钟之间优化）。

5. 孵育期间，用新鲜培养基按100: 1的比例稀释【试剂B】，制备适量1X PI染色培养基。

6. 孵育结束后，300 g离心5分钟，PBS清洗1次，再次300 g离心5分钟。

7. 离心结束后，弃上清，每孔加入200 μ L 1X PI染色培养基，室温孵育2~5分钟。

注：流式染色中，1X PI染色培养基每孔用量请参考表2“每孔总体积”。

8. 流式细胞仪上机分析。

注意事项

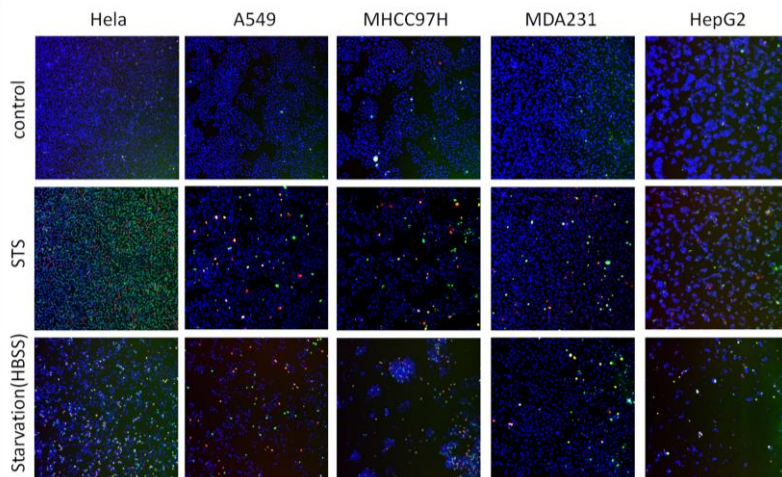
1. 待实验的细胞应确保其活力，因此在本试剂盒染料孵育过程中，稀释培养基均应使用细胞类型所依赖的培养基，如目前常用的含有10%血清的D-MEM或RPMI 1640细胞培养基。

2. 【试剂A】组分对caspase-3/7活性的检测灵敏，一般孵育时间在0.5-1小时之间即可完成检测，孵育时间不可太长，建议不超过1小时。

3. 在激光共聚焦显微镜或高内涵成像拍照分析中，为了提高信噪比，需要在全部染色结束后进行PBS清洗并更换为新鲜培养基方可进行拍照分析；而若采用流式细胞仪分析手段时，在PI染色结束后不需要对细胞进行清洗与更换培养基即可直接上机。

4. 采用其他成像分析系统（如普通荧光显微镜）进行观察分析时如果发现FITC信号较弱，建议对试剂盒检测步骤进行优化调整，例如延长曝光时间、适当提高试剂A母液的用量，或延长混合染色培养基孵育时间（不可超过1小时）。

示例：



绿色荧光：Caspase-3/7 荧光底物； 红色荧光：PI； 蓝色荧光：Hoechst33342

图 1. 十字孢碱 (STS) 和饥饿处理对不同细胞系凋亡的影响

对 Hela、A549、MHCC97H、MDA231 及 HepG2 细胞系分别进行 STS 处理 20 h 或 HBSS 处理 20 h，处理结束后进行染色并通过高内涵成像系统 In Cell Analyzer 6500HS (GE healthcare) 进行检测。

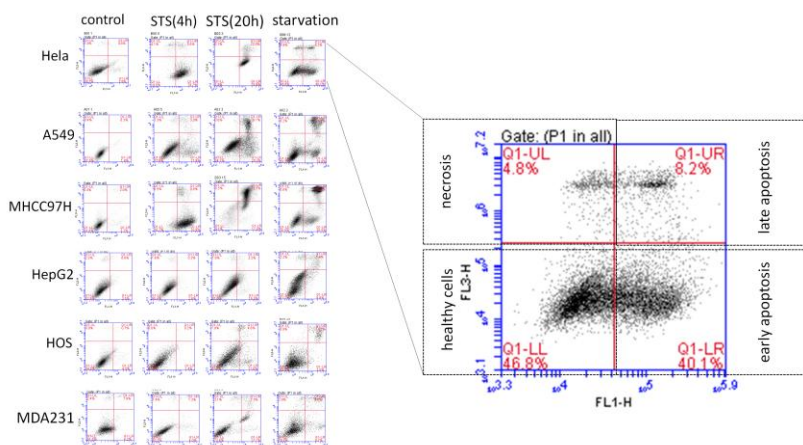


图 2. 十字孢碱 (STS) 或饥饿对不同癌细胞系凋亡的影响

对不同癌细胞分别进行 STS 处理 4h/20h 或 HBSS 处理 20 h，处理结束后进行染色并进行流式细胞仪分析。