

## 活细胞Caspase-3活性与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1077S	活细胞Caspase-3活性与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1077M	活细胞Caspase-3活性与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒	50次

### 产品简介:

- 碧云天生产的活细胞Caspase-3活性与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒(Caspase-3 Activity and Apoptosis Detection Kit for Live Cell)是基于新型的具有细胞膜通透性的Caspase-3/7绿色荧光底物GreenNuc™ Caspase-3 Substrate联合细胞凋亡红色荧光探针Annexin V-mCherry来检测培养细胞中Caspase-3活性和细胞凋亡的红绿荧光双染试剂盒，可用于实时监测活细胞中Caspase-3活性和凋亡情况。本试剂盒适用于流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测系统进行检测。
- 细胞凋亡(Apoptosis)是生物体发育等生命过程中普遍存在的、由基因决定的细胞主动有序的死亡方式。当细胞遇到内、外环境因子刺激时，启动基因调控的自杀保护措施，去除体内非必需细胞或即将发生特化的细胞。在这一过程中，细胞脱离体或裂解为若干凋亡小体，并迅速被巨噬细胞或邻近细胞清除，这是一种由基因控制、高度有序的细胞自主死亡，包含一系列信号事件组成的通路。细胞凋亡失调与多种疾病有关，例如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)和癌症等。
- Caspase (cysteine-dependent aspartate-specific proteases)的全称为天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶，存在于蛋白质中，主要利用半胱氨酸(cysteine)侧链选择性地高效切割含有天冬氨酸(aspartate)的多肽底物，在介导细胞凋亡(apoptosis)过程中起重要作用，并参与细胞的炎症、生长和分化等过程。Caspase-3也称CPP32、Yama或apopain，属于caspase家族的CED-3亚家族(CED-3 subfamily)，是哺乳动物细胞中研究最多的一个caspase。Caspase-3是细胞凋亡过程中的一个关键酶，可以直接特异性剪切许多caspase底物，包括PARP (poly ADP-ribose polymerase)、ICAD (Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease)、proCaspase-6、7和9、gelsolin和fodrin等。这些由Caspase-3介导的蛋白剪切是细胞凋亡分子机制的重要组成部分。同时Caspase-3还参与细胞核凋亡过程，如染色质固缩(chromatin condensation)，DNA片段化(DNA fragmentation)等。另外，Caspase-3对凋亡过程中的细胞起泡(cell blebbing)也起到了关键作用。
- GreenNuc™ Caspase-3为耦合DNA绿色荧光染料的多肽DEVD，该底物中的DEVD是caspase 3/7的识别序列，并带有大量负电荷。这些负电荷和DNA带有的负电荷相互排斥，使底物中的DNA绿色荧光染料不能结合DNA，也就不能被激发产生绿色荧光。最初没有荧光的底物穿过细胞膜进入细胞质，在凋亡细胞中被Caspase-3/7识别并剪切，释放出活化的DNA绿色荧光染料分子。活化的DNA绿色荧光染料分子迁移进入细胞核，与DNA结合后，形成GreenNuc™-DNA复合物，就可以被激发而产生明亮的绿色荧光。
- 在正常活细胞中，磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)位于细胞膜的近细胞质面。而在凋亡细胞中，PS从质膜的内部外翻到细胞表面即细胞膜外侧，从而使PS暴露于细胞外部。在白细胞的凋亡过程中，白细胞表面的PS标记可以被巨噬细胞识别，从而最终被巨噬细胞吞噬。人血管抗凝血剂Annexin V是一种Ca<sup>2+</sup>依赖性磷脂结合蛋白，分子量为35-36kDa，对PS具有高亲和力。用带有红色荧光的mCherry标记的Annexin V (Annexin V-mCherry)染色细胞，就可以通过荧光显微镜、激光共聚焦显微镜或流式细胞仪等荧光检测设备非常简单而直接地检测到PS的外翻这一细胞凋亡的重要特征。需要指出的是对于发生坏死(necrosis)的细胞，由于细胞膜的完整性被破坏，位于细胞膜内侧的PS也会被Annexin V-mCherry染色。本试剂盒不区分凋亡细胞和坏死细胞，如有需要，可参考C1062 Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒。
- 本试剂盒检测的是GreenNuc™-DNA复合物的绿色荧光和Annexin V-mCherry红色荧光，GreenNuc™-DNA的最大激发光波长为500nm，最大发射光波长为530nm；Annexin V-mCherry的最大激发光波长为587nm，最大发射光波长为610nm。GreenNuc™-DNA复合物和Annexin V-mCherry的激发光谱和发射光谱参考图1。

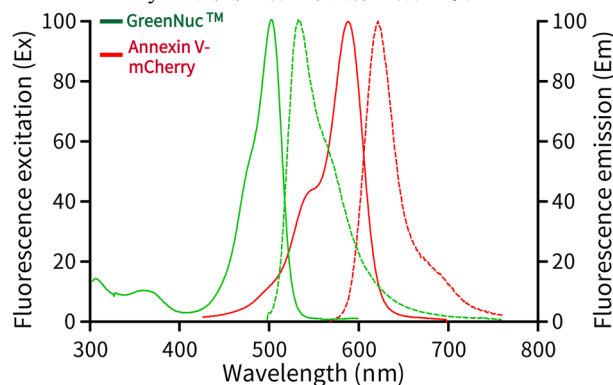


图1. GreenNuc™-DNA复合物(绿色)和Annexin V-mCherry(红色)的激发光和发射光光谱。

- 本试剂盒中检测试剂配制后直接加入细胞中，孵育15-30分钟后即可直接用于荧光显微镜、流式细胞仪或荧光酶标仪检测等检测系统进行定性或定量检测。正常细胞不会被GreenNuc™和Annexin V-mCherry所染色，Caspase-3活性高的凋亡细胞的细胞核呈明亮的绿色荧光，凋亡细胞的细胞膜呈红色荧光(图F-H)。使用本试剂盒检测Caspase-3/7活性和细胞凋亡的效果参考图2。

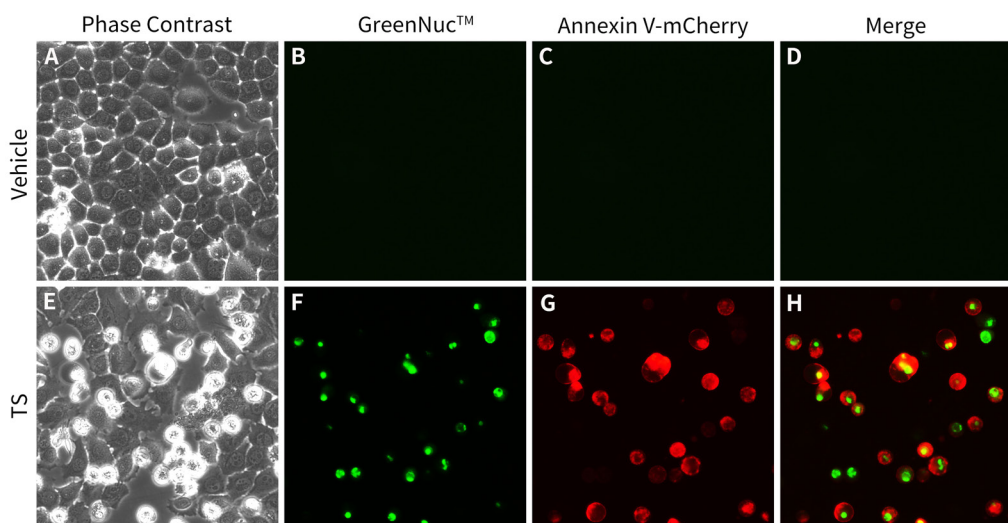


图2. 活细胞Caspase-3活性与细胞凋亡检测试剂盒检测BGC-823细胞(人胃癌细胞) Caspase-3活性和细胞凋亡的效果。正常状态的BGC-823细胞在明场下的形态见图A；正常细胞不会被GreenNuc™和Annexin V-mCherry所染色(图B-D)。TS诱导3小时后的BGC-823细胞在明场下的形态见图E；细胞内Caspase-3活性高的凋亡细胞核呈明亮的绿色荧光，凋亡细胞的细胞膜呈红色荧光(图F-H)。TS是由TNF $\alpha$ 、SM-164组成的细胞凋亡诱导试剂(C0006S)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异，本图仅供参考。

- **本试剂盒检测可以实时监测细胞内Caspase-3/7活性。**传统的Caspase活性检测试剂盒，通常需要裂解细胞或组织样品后进行显色或荧光检测；通过Western检测Caspase本身和剪切后蛋白的表达情况，也只能检测Caspase的表达情况，从一定程度上反应酶活性；基于荧光标记的Caspase抑制剂的检测技术(fluorochrome-labeled inhibitors of caspases, FLICA)可以进入活细胞检测Caspase活性，但其荧光探针本身就是不可逆的Caspase抑制剂，所以无法在活细胞中实时监测Caspase的活力。而本试剂盒中提供的荧光底物GreenNuc™ Caspase-3对细胞活性没有明显的抑制作用，不影响Caspase的表达，不抑制细胞的凋亡过程，有助于实时监测细胞凋亡。
- **本试剂盒功能强大。**使用本试剂盒检测Caspase-3/7的活性的同时，可以实时观察细胞核在凋亡过程中的形态学变化，还能够检测细胞凋亡过程中PS外翻这一经典事件。在众多凋亡的细胞内，不同细胞可能处在不同阶段并经历着凋亡过程中的不同事件，因而研究中很重要的一点就是能实时独立地跟踪这些事件，从而更好地了解事件之间的相互关系。本试剂盒可以通过荧光显微镜、流式细胞仪来研究这些不同事件的时间、空间关系。
- 本试剂盒小包装C1077S和中包装C1077M用于流式细胞仪分别可以进行20次和50次检测；用于96孔板每孔检测体系的体积为100 $\mu$ l时分别可以检测40次和100次，检测体系体积为200 $\mu$ l时分别可以检测20次和50次。实际检测次数会因为检测体系和使用的底物浓度而有所不同。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C1077S-1	Annexin V-mCherry	100 $\mu$ l
C1077S-2	GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (1mM)	20 $\mu$ l
C1077S-3	Annexin V-mCherry Binding Buffer	12ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1077M-1	Annexin V-mCherry	250 $\mu$ l
C1077M-2	GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (1mM)	50 $\mu$ l
C1077M-3	Annexin V-mCherry Binding Buffer	30ml
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存，一年有效。Annexin V-mCherry和GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (1mM)避光保存。

#### 注意事项：

- 避免微生物污染，如有细菌或真菌污染，会严重影响检测效果。

- 染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
- 如果细胞收集过程中使用了胰酶，需注意设法去除残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解Annexin V-mCherry，最终导致染色失败。
- GreenNuc™ Caspase-3 Substrate不是很稳定，应尽量避免反复冻融(一般不要超过三次)。
- 用于流式细胞仪检测时，如果发现Annexin V-mCherry或GreenNuc™信号过强，并且通过调整相关设置和参数也无法改善，可以用PBS (C0221A)将Annexin V-mCherry或GreenNuc™稀释3-10倍后再进行检测。
- 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，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。

## 使用说明：

### 1. 对于悬浮细胞：

- 在凋亡诱导结束后，1000×g离心5分钟，弃上清，收集细胞，用PBS轻轻重悬细胞并计数。**注：**PBS重悬不能省略，该步骤起到了洗涤细胞的作用，可以保证后续Annexin V-mCherry的结合。
- 取5-10万重悬的细胞，1000×g离心5分钟，弃上清，加入194μl Annexin V-mCherry Binding Buffer轻轻重悬细胞。
- 加入5μl Annexin V-mCherry和1μl GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (1mM)，轻轻混匀。
- 室温(20-25℃)避光孵育20-30分钟，孵育完毕后置于冰浴中。**注：**可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以适当重悬细胞2-3次以改善标记效果。
- 随即进行流式细胞仪检测，GreenNuc™-DNA为绿色荧光(Ex/Em=500/530nm)，Annexin V-mCherry为红色荧光(Ex/Em=587/610nm)。如果用于荧光显微镜下检测，1000×g离心5分钟，收集细胞，用50-100μl Annexin V-mCherry Binding Buffer轻轻重悬细胞，涂片后，荧光显微镜下观察。注意：细胞在染色后须尽快完成检测，通常宜在1小时之内完成检测。用于流式细胞仪检测时，如果发现Annexin V-mCherry单独染色时出现了过多的GreenNuc™ Caspase-3假阳性细胞，并且通过调整相关设置和参数也无法改善，可以用PBS将Annexin V-mCherry稀释3-10倍后再进行检测。

### 2. 对于贴壁细胞：

- 在凋亡诱导结束后，把细胞培养液吸出至一合适离心管内，PBS洗涤细胞一次，加入适量胰酶细胞消化液(可含有EDTA)消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞脱落为止，吸除胰酶细胞消化液，避免胰酶的过度消化。
- 加入步骤2a中收集的细胞培养液，稍混匀，转移到离心管内，1000×g离心5分钟，弃上清，收集细胞，用PBS轻轻重悬细胞并计数。**注：**加入步骤2a中的细胞培养液一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞，另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解后续加入的Annexin V-mCherry导致染色失败。
- 取5-10万重悬的细胞，1000×g离心5分钟，弃上清，加入194μl Annexin V-mCherry Binding Buffer轻轻重悬细胞。
- 加入5μl Annexin V-mCherry和1μl GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (1mM)，轻轻混匀。
- 室温(20-25℃)避光孵育20-30分钟，孵育完毕后置于冰浴中。**注：**可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以适当重悬细胞2-3次以改善标记效果。
- 随即进行流式细胞仪检测，GreenNuc™-DNA为绿色荧光(Ex/Em=500/530nm)，Annexin V-mCherry为红色荧光(Ex/Em=587/610nm)。如果用于荧光显微镜下检测，1000×g离心5分钟，收集细胞，用50-100μl Annexin V-mCherry Binding Buffer轻轻重悬细胞，涂片后，荧光显微镜下观察。注意：细胞在染色后须尽快完成检测，通常宜在1小时之内完成检测。用于流式细胞仪检测时，如果发现Annexin V-mCherry单独染色时出现了过多的GreenNuc™ Caspase-3假阳性细胞，并且通过调整相关设置和参数也无法改善，可以用PBS将Annexin V-mCherry稀释3-10倍后再进行检测。

### 3. 对于贴壁细胞的原位荧光显微镜检测：

- 注：**本方法的优点是可以原位观察细胞凋亡，缺点是部分凋亡由于不贴壁而检测不到。
- 选做：在凋亡诱导结束后，对于培养于24孔板、48孔板或96孔板的细胞进行离心，1000×g离心5分钟。
  - 吸除细胞培养液，加入PBS洗涤一次。
  - 加入194μl Annexin V-mCherry Binding Buffer。
  - 加入5μl Annexin V-mCherry和1μl GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (1mM)，轻轻混匀。
  - 室温(20-25℃)避光孵育20-30分钟。可以使用铝箔进行避光。
  - 随即在荧光显微镜下观察，GreenNuc™-DNA为绿色荧光(Ex/Em=500/530nm)，Annexin V-mCherry为红色荧光(Ex/Em=587/610nm)。注意：细胞在染色后须尽快完成检测，通常宜在1小时之内完成检测。

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C1052	细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1056	细胞凋亡与坏死检测试剂盒	100次
C1062S	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1062M	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1062L	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	100次
C1065S	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1065M	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	50次

C1065L	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	100次
C1067S	Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1067M	Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1069S	Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1069M	Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1069L	Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	100次
C1070S	Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1070M	Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1071S	线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1071M	线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1073S	活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	20次
C1073M	活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	50次
C1075S	膜通透性细胞凋亡与坏死检测试剂盒	50次
C1075M	膜通透性细胞凋亡与坏死检测试剂盒	200次
C1077S	活细胞Caspase-3活性与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒	20次
C1077M	活细胞Caspase-3活性与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒	50次
C2015M	Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	500次
C1086	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	20次
C1088	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	50次
C1089	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	20次
C1090	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	50次
C1091	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	20次
C1098	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	50次

Version 2020.07.09