

## GreenNuc™活细胞Caspase-3活性检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1168S	GreenNuc™活细胞Caspase-3活性检测试剂盒	20-40次
C1168M	GreenNuc™活细胞Caspase-3活性检测试剂盒	100-200次

### 产品简介:

- GreenNuc™活细胞Caspase-3活性检测试剂盒(GreenNuc™ Caspase-3 Assay Kit for Live Cells)是一种使用新型的具有细胞膜通透性的Caspase-3/7绿色荧光底物来检测活细胞中Caspase-3/7活性的试剂盒，可用于实时检测活细胞的凋亡情况。
- Caspase (Cysteine-requiring Aspartate Protease)是一个在细胞凋亡过程中起重要作用的蛋白酶家族。Caspase-3也称CPP32、Yama或apopain，有时被写作Caspase 3或caspase 3，属于caspase家族的CED-3亚家族(CED-3 subfamily)，是细胞凋亡过程中的一个关键酶。Caspase-3是哺乳动物细胞中研究最多的一个caspase。Caspase-3可以剪切procaspase-3、6、7和9，并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)、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。另外，Caspase-3在细胞核凋亡过程中也起到了关键作用，包括染色质固缩(chromatin condensation)，DNA片段化(DNA fragmentation)等。同时Caspase-3对细胞起泡(cell blebbing)也起到关键作用。
- 本试剂盒的检测原理参见图1。GreenNuc™ Caspase-3 Substrate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。当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，从而释放出活化的DNA绿色荧光染料分子。当这种DNA绿色荧光染料迁移进入细胞核，并和DNA结合后，就可以被激发而产生明亮的绿色荧光。

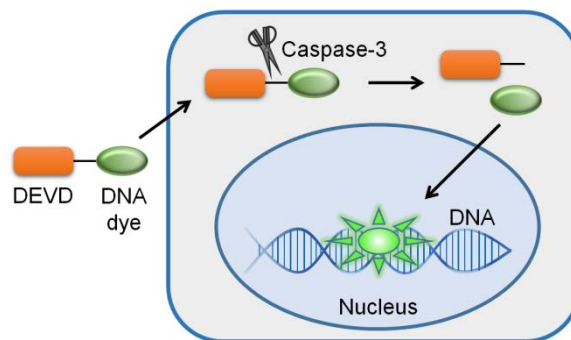


图1. GreenNuc™活细胞Caspase-3活性检测试剂盒的检测原理图。

- 检测试剂直接加入细胞培养液中，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进行定性或定量检测。本试剂盒同时提供了Caspase-3/7的可逆抑制剂Ac-DEVD-CHO，以方便确认本试剂盒的检测效果。HeLa细胞用本试剂盒检测细胞凋亡的效果参见图2。


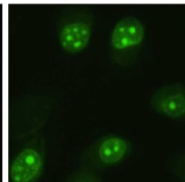
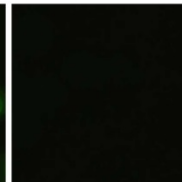
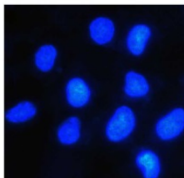
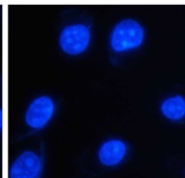
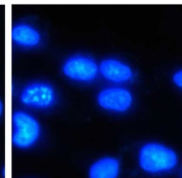
	Camptothecin	-	+	+
GreenNuc™ Caspase-3 Substrate		+	+	+
Ac-DEVD-CHO		-	-	+
GreenNuc™				
Hoechst 33342				

图2. HeLa细胞用GreenNuc™活细胞Caspase-3活性检测试剂盒检测细胞凋亡的效果图。未诱导凋亡组观察不到绿色荧光(最左侧一列); 用10μM Camptothecin(喜树碱)孵育过夜诱导细胞凋亡, 并加入5μM GreenNuc™ Caspase-3 Substrate孵育30分钟, 可以观察到凋亡细胞细胞核处的绿色荧光(中间一列); 而在诱导凋亡的同时加入20μM Caspase-3/7抑制剂Ac-DEVD-CHO同时孵育, 凋亡阳性的绿色荧光细胞数量被显著抑制, 说明Caspase-3/7被抑制后, 底物不能被剪切, 没有活化的DNA绿色荧光染料进入细胞核并染色基因组DNA (最右侧一列)。

- **本试剂盒检测可以实时检测凋亡情况。**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, 而不能用于活细胞的Caspase活性检测。通过Western检测Caspase本身的剪切激活, 也只能检测样品中的Caspase的平均酶活性。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检测Caspase的活力。本试剂盒中的底物不会抑制细胞的凋亡过程, 可以实时监测细胞凋亡的进度。
- **本试剂盒是双功能的:**既可以检测Caspase-3/7的活性, 又可以显示细胞核在凋亡过程中的形态学变化。在众多凋亡的细胞内, 不同细胞可能处在不同时期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。本试剂盒可以和其它一些荧光探针(如线粒体探针、其它凋亡探针)配合, 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。
- **本试剂盒后续兼容性强:**使用本试剂盒检测后, 后续可以继续使用多聚甲醛固定, 并进行后续的各种免疫染色, 包括免疫荧光、免疫组化等。
- 本试剂盒小包装C1168S如果用于96孔板或流式细胞仪可以进行20-40次检测, 96孔板每孔检测体系的体积为100μl时可以检测40次, 检测体系体积为200μl时仅可以检测20次; C1168M可检测样品的数量为小包装C1168S的5倍。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
C1168S-1	GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (1mM)	20μl
C1168S-2	Ac-DEVD-CHO (10mM)	10μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1168M-1	GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (1mM)	100μl
C1168M-2	Ac-DEVD-CHO (10mM)	20μl
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20°C保存, 一年有效。GreenNuc™ Caspase-3 Substrate须-20°C避光保存。

#### 注意事项:

- 本试剂盒染色兼容多聚甲醛或甲醛固定, 但与甲醇固定不兼容。建议用4%多聚甲醛固定10-15分钟, 固定后的细胞可以用免疫染色通透液(Triton X-100) (P0096)或含有0.1% Triton X-100的适当溶液进行通透处理后进行后续染色。固定或通透等处理时间过长, 对本试剂盒染色的亮度会有一些影响。
- 荧光染料有一定的淬灭性, 请注意避免长时间在荧光显微镜下观察。
- 本试剂盒组分须尽量避免反复冻融。如果多次使用, 请注意适当分装。
- Ac-DEVD-CHO在4°C、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内, 可以20-25°C水浴温育片刻至全部融解后使用。
- 有文献报道少数类型的细胞凋亡检测不到Caspase-3/7的激活。
- 本试剂盒染色后, 推荐使用碧云天生产的Hoechst 33342活细胞染色液(100X) (C1027/C1028/C1029)复染, 复染后可见所有细胞核呈现明亮的蓝色荧光。
- 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. 实验优化:

细胞密度、GreenNuc™ Caspase-3 Substrate浓度、抑制剂浓度、凋亡诱导条件需要提前优化。

- 细胞密度不宜太少, 一般要在50%-90%。
- GreenNuc™ Caspase-3 Substrate的推荐使用浓度为5μM, 最佳浓度可以在1-10μM之间适当摸索。该底物可以直接加在细胞培养液、PBS或其它适当溶液中直接处理细胞。对于贴壁细胞, 在加底物前最好更换培养液。底物孵育结束后, 培养液可自行选择是否更换。
- 抑制剂Ac-DEVD-CHO可以抑制Caspase-3/7的活力, 由于Ac-DEVD-CHO是可逆的抑制剂, 所以抑制剂可以预先加入培养液中处理细胞, 室温孵育15-30分钟后再加入底物; 也可以在诱导凋亡时就加入抑制剂, 添加底物前换液时补加原来浓度的抑

制剂。抑制剂的浓度一般是底物的2-4倍。比如用5 $\mu$ M底物时，用10-20 $\mu$ M的抑制剂。有一些细胞需要用非可逆的抑制剂，如Caspase抑制剂Z-DEVD-FMK (C1202)。

d. 各个类型细胞株的凋亡诱导条件请参考文献。

## 2. 对照

建议设定以下对照：

- 阴性对照：未诱导凋亡的细胞。
- 阳性对照：诱导凋亡，未添加抑制剂Ac-DEVD-CHO。
- 阳性对照：诱导凋亡，并加入抑制剂Ac-DEVD-CHO。本对照用于进一步确认本试剂盒的检测效果。

## 3. 荧光显微镜检测

- 选择合适的方法诱导细胞凋亡，未经诱导处理的作为阴性对照。Ac-DEVD-CHO抑制剂组添加一定浓度的抑制剂。
- 用含5 $\mu$ M底物的新鲜培养液或者PBS对细胞进行换液，Ac-DEVD-CHO抑制剂组要补充原来浓度的抑制剂。
- 室温避光孵育15-30分钟(如有需要可以孵育更长时间)。
- 细胞可以在含有底物的培养基中直接观察，也可换液后进行观察。使用观察绿色荧光的滤光片(最大激发/发射波长：500/530nm)。
- 用Hoechst 33342 (推荐使用碧云天生产的C1027/C1028/C1029 Hoechst 33342活细胞染色液(100X))复染后可见细胞核有蓝色荧光。HeLa细胞用本试剂盒检测细胞凋亡的效果参见图2。

## 4. 流式细胞仪检测

- 选择合适的方法诱导细胞凋亡，未经诱导处理的作为阴性对照。抑制剂组添加一定浓度的抑制剂。
- 贴壁细胞，先用胰酶或者其它方法消化细胞。用培养液或者缓冲液重悬细胞，使细胞浓度在10<sup>6</sup>/ml。
- 吸取200 $\mu$ l至流式检测管，加入1 $\mu$ l的底物，立即混匀使底物终浓度为5 $\mu$ M。不同的细胞合适的底物浓度不同，需要自行进行优化。
- 室温避光孵育15-30分钟(如有需要可以孵育更长时间)。
- 加入300 $\mu$ l培养基或者适当溶液，流式细胞仪分析。检测绿色荧光通道(最大激发/发射波长：500/530nm)。

## 5. 酶标仪检测

- 贴壁细胞生长在黑色96孔板中；对于悬浮细胞，将密度调整至10<sup>6</sup>细胞/ml，0.2ml细胞悬液/孔。
- 选择合适的方法诱导细胞凋亡，未经诱导处理的作为阴性对照。抑制剂组添加一定浓度的抑制剂。
- 贴壁细胞用含5 $\mu$ M底物的新鲜培养液或者PBS对细胞进行换液，Ac-DEVD-CHO抑制剂组要补充原来浓度的抑制剂。如果是悬浮细胞，就直接加入底物或抑制剂。
- 室温避光孵育15-30分钟(如有需要可以孵育更长时间)。
- 对于悬浮细胞，轻轻摇晃重悬细胞。酶标仪设置激发波长485nm，发射波长515nm。贴壁细胞建议使用底读的方式。细胞密度的变化可能导致不准确的读数。

## 6. 细胞核的染色：

如果有必要，细胞可以用Hoechst 33342染料染细胞核，此时细胞核为蓝色荧光(激发/发射波长：346/460nm)。

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C1027	Hoechst 33342活细胞染色液(100X)	0.1ml
C1101	Caspase 1活性检测试剂盒	20次
C1102	Caspase 1活性检测试剂盒	100次
C1107	Caspase 2活性检测试剂盒	20次
C1108	Caspase 2活性检测试剂盒	100次
C1115	Caspase 3活性检测试剂盒	20次
C1116	Caspase 3活性检测试剂盒	100次
C1121	Caspase 4活性检测试剂盒	20次
C1122	Caspase 4活性检测试剂盒	100次
C1135	Caspase 6活性检测试剂盒	20次
C1136	Caspase 6活性检测试剂盒	100次
C1151	Caspase 8活性检测试剂盒	20次
C1152	Caspase 8活性检测试剂盒	100次
C1157	Caspase 9活性检测试剂盒	20次
C1158	Caspase 9活性检测试剂盒	100次
C1168S	GreenNuc™活细胞Caspase-3活性检测试剂盒	20-40次
C1168M	GreenNuc™活细胞Caspase-3活性检测试剂盒	100-200次
C1202-0.02ml	Caspase抑制剂Z-VAD-FMK	20mM×0.02ml
C1206-10mM	Caspase 3抑制剂Ac-DEVD-CHO	10mM×0.1ml

## 使用本产品的文献：

1. Song X, Shen Y, Lao Y, Tao Z, Zeng J, Wang J, Wu H. CXCL9 regulates acetaminophen-induced liver injury via CXCR3. *Exp Ther Med*. 2019 Dec;18(6):4845-4851.
2. Tian Wei, Xie Xiaojun, Cao Peilong. Magnoflorine improves sensitivity to doxorubicin (DOX) of breast cancer cells via inducing apoptosis and autophagy through AKT/mTOR and p38 signaling pathways. *Biomed Pharmacother*. 2020 Jan;121:109139.
3. Ming-Yue Chen, Ze-Kuan Xiao, Xue-Ping Lei, Jie-Xia Li, Xi-Yong Yu, Jian-Ye Zhang, Guo-Dong Ye, Yu-Juan Guo, Guangquan Mo, Chu-Wen Li, Yu Zhang, Ling-Min Zhang, Zhi-Qiang Lin, Ji-Jun Fu. Preparation, characterization and in vitro-in vivo evaluation of bortezomib supermolecular aggregation nanovehicles. *J NANOBIO TECHNOLOG*. 2020 Apr 3;18(1):57.

Version 2021.09.01