

RH421 膜电位荧光探针

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。

应用范围

细胞凋亡检测

产品货号

S1005

储运条件

-20°C 避光干燥保存，有效期见外包装；冰袋运输。

产品特点

稳定性好： 荧光亮度高且抗淬灭性好；

批间差小： 产品为公司自研，批间差控制的好。

产品组分

组分	S1005
SuperView™ 488 Caspase-3 substrate, 1 mM in DMSO	125 µL

产品参数

Ex/Em: 500/530 nm (with DNA)

注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 细胞可以用终浓度为 1 µM 的 Hoechst 33342 染料共同染色，使细胞核产生蓝色荧光染色(Ex/Em: 346/460 nm)。
- SuperView™ 488 染色可以被甲醛固定，但与甲醇固定不兼容。
- 甲醛固定的 SuperView™ 488 染色细胞可以用 0.1% TritonX-100 处理后进行后续染色，但处理后的染色的亮度可能会减弱。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 本产品仅限于科研，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。

自备材料

1. 耗材
1.5 mL 离心管
2. 仪器
流式细胞仪

操作步骤

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课程研究。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。

(1) 对照

我们建议您设定以下对照：

- 1) 阴性对照：不诱导凋亡的细胞。
- 2) 阳性对照：诱导凋亡的细胞。
- 3) 抑制剂对照：诱导细胞凋亡同时（或提前 10~30 min）孵育 Caspase-3/7 抑制剂，最后再添加 SuperView™ 488 Caspase-3 底物。

(2) Ac-DEVD-CHO Caspase-3 抑制剂对照

试剂盒中的 Caspase-3/7 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 可以用来确认 Caspase-3/7 依赖于 SuperView™ 488 的荧光信号。对于抑制剂对照，抑制剂的终浓度应该至少是底物浓度的 2 倍（例如当使用 5 µM SuperView™ 488 底物时，Ac-DEVD-CHO 浓度为 10 µM）。添加底物前在室温下孵育 Ac-DEVD-CHO 15~30 min，加入底物后，孵育液中继续保留抑制剂。Ac-DEVD-CHO 是可逆的竞争性抑制剂。在某些细胞类型，有效的 Caspase-3/7 抑制剂需要使用不可逆的抑制剂，如 Z-DEVD-FMK，或需要在凋亡诱导之前或诱导过程中添加抑制剂。

(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，执行 SuperView™ 488 Caspase-3 实验前先用胰蛋白酶或其他方法消化细胞。
- 3) 冲液重悬细胞，使细胞密度为 10⁶ 个/mL。
- 4) 取 0.2 mL 细胞悬液至流式细胞试管。
- 5) 对照样本，用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞（见上文(2)Ac-DEVD-CHO Caspase-3 抑制剂对照）。
- 6) 200 µL 细胞悬液中加入 5 µL 0.2 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。
- 7) 室温避光孵育细胞 15~30 min。
- 8) 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(Ex/Em: 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) 抑制剂对照样本，用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞（见上文(2)Ac-DEVD-CHO Caspase-3 抑制剂对照）。
- 3) 用含有 5 µM Substrate 的新鲜培养基或 PBS 对细胞进行换液（见上文 1. 实验优化）。对于抑制剂对照组，抑制剂与底物一同孵育。
- 4) 室温下孵育细胞 30 min 或更长时间。
- 5) 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(Ex/Em: 485/515 nm)。

(5) 荧光酶标仪

1) 贴壁细胞生长在黑色 96 孔板中；悬浮细胞，调整密至 10^6 个/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：细胞可能在管或瓶中处理，然后转移到 96 孔检测板。

3) 抑制剂对照样本，用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞（见上文(2) Ac-DEVD-CHO Caspase-3 抑制剂对照）。

4) 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(见上文(1)实验优化)。对于抑制剂对照组，抑制剂与底物一同孵育。

5) 细胞可以在含有 Substrate 的培养基中直接观察。

6) 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。

FAQ

1.问：产品稳定性如何？

答：该物质稳定性很好，用户反馈该产品 37°C 放置 4~5 天，效果仍然很好该物质稳定性很好。

2.问：何时加入细胞中？

答：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。

3.问：可用于组织染色吗？

答：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。

4.问：可用于随后的免疫染色吗？

答：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。

5.问：特异性如何？

答：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。

6.问：适用于哪些细胞？

答：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。

同系列产品

产品货号	产品名称	选购指南
S6007	SuperView™ 488 Caspase-3 活细胞分析试剂盒	提供抑制剂，方便客户做对照组
S1005	SuperView™ 488 Caspase-3 底物, 1 mM in DMSO	荧光标记底物