

## Caspase 4 Activity Detection Substrate for Flow Cytometry

Cat. No: E-CK-A484

Size: 20 Tests/100 Tests

产品编号	组分名称	20 Tests	100 Tests	Storage
E-CK-A484	Caspase 4 Substrates(Green) (1mM)	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L	-20°C, shading light
	说明书		一份	

### 保存条件

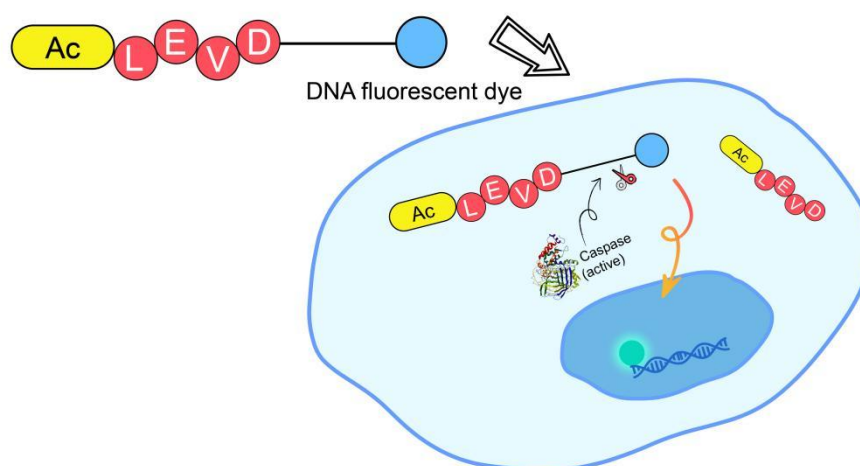
Caspase 4 Substrates(Green)(1mM)可在-20°C避光保存 1 年有效。

### 产品简介

Elabscience®自主研发的 Caspase 4 Substrates(Green)采用新型的具有细胞膜通透性的 Caspase-4 绿色荧光底物，可实时检测活细胞中 Caspase-4 酶的活性，且不会抑制细胞的凋亡进程。染色的细胞呈绿色荧光，可用流式细胞仪 FL1 或 FITC 检测通道检测，也可使用荧光显微镜 488nm 激发波长进行观测分析。染色后的细胞也可兼容后续的细胞固定和渗透，荧光强度和检测结果稳定。

### 检测原理

Caspase 4 Substrates(Green)采用 caspase-4 识别序列(LEVD)耦联到高亲和力的 DNA 荧光染料，具有细胞膜通透性，能够穿透质膜进入细胞质。底物本身无荧光，并和 DNA 具有电荷排斥效应，在细胞凋亡过程中，caspase-4 切割底物并释放高亲和力的 DNA 染料，与 DNA 结合后产生强荧光，从而检测 caspase-4 活性并可视化细胞凋亡过程中细胞核的形态变化。



For Research Use Only

Tel: 400-999-2100

Web: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

Email: [techsupport@elabscience.cn](mailto:techsupport@elabscience.cn)

Rev. V1.0

## 检测样本类型

- √贴壁细胞
- √悬浮细胞

## 自备试剂耗材及仪器

### ➤ 试剂

75%乙醇, 细胞基础培养基, 无菌 PBS 缓冲液等。

### ➤ 仪器

水平离心机, CO<sub>2</sub> 培养箱, 荧光显微镜, 流式细胞仪, 生物安全柜等。

### ➤ 耗材

细胞培养皿, 移液器, 细胞爬片, 载玻片等。

## 实验操作

### ➤ 流式细胞仪检测

- (1) 收集细胞, 250 g 离心 5 min, 去上清, 加入 1 mL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 250 g 离心 5 min, 去上清。
- (2) 每组  $2-5 \times 10^5$  个细胞加入 400  $\mu$ L PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 加入 0.4  $\mu$ L Caspase 4 Substrates(Green), 轻轻吹打混匀, 37°C 避光孵育 30 min。
- (3) 孵育完成后, 加入 1 mL PBS 缓冲液重悬细胞, 250 g 离心 5 min, 去上清。
- (4) 适当体积的 PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 流式细胞仪检测。(Caspase 4 可用 FL1 或 FITC 检测通道。)

**注:** 孵育 Caspase 4 Substrates(Green)的 PBS 缓冲液不能含有血清或 BSA, 会导致非特异性背景增强; 若细胞中酶活性较低, 可适当增加 Caspase 4 Substrates(Green)(1 mM)的使用剂量, 使终浓度为 2-5  $\mu$ M。

### ➤ 荧光显微镜检测

- (1) 小心吸除贴壁细胞的培养基, 每孔加入适量 PBS 洗涤细胞, 吸除 PBS。
- (2) 使用基础培养基或 PBS 缓冲液, 按照 96 孔板每孔 100  $\mu$ L 或 24 孔板每孔 200  $\mu$ L 的比例按照下表配制足量的 Caspase 4 染色工作液, 轻轻吹打混匀。

组分	基础培养基/PBS 缓冲液	Caspase 4 Substrates(Green) (1 mM)
Caspase 4 染色工作液 (200 $\mu$ L)	200 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Caspase 4 染色工作液 (1 mL)	1000 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Caspase 4 染色工作液 (2 mL)	2000 $\mu$ L	10 $\mu$ L

- (3) 贴壁缓慢加入 Caspase 4 染色工作液, 轻轻晃动培养板, 使染色液充分浸润细胞, 37°C 避光孵育 30-60min。
- (4) 孵育结束后, 无需洗涤, 可直接在荧光显微镜下观察染色效果。(Caspase 4 为绿色荧光, Ex/Em=490nm/535nm)
- (5) 若是悬浮细胞, 则收集细胞沉淀后, 按照  $2-5 \times 10^5$  个细胞加入 200  $\mu$ L PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 加入 1  $\mu$ L Caspase 4 Substrates(Green), 轻轻吹打混匀, 37°C 避光孵育 30-60min, 再加入

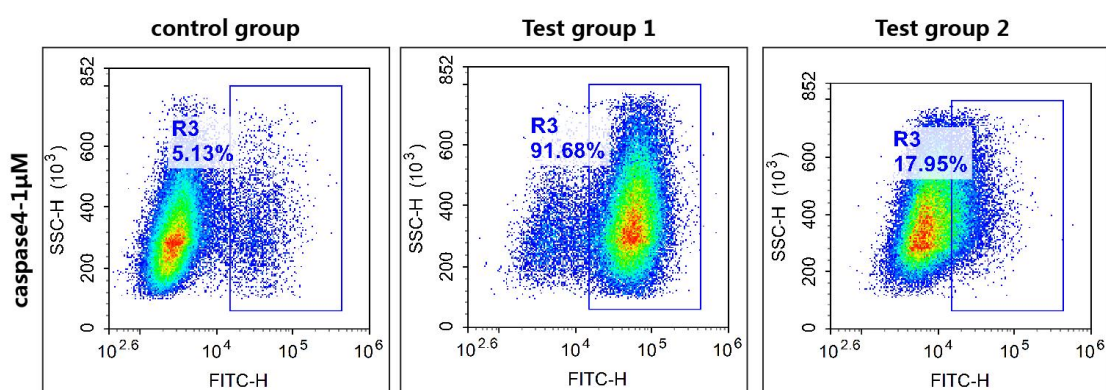
## For Research Use Only

1 mL PBS 缓冲液, 250g 离心 5 min, 吸除部分上清, 留取约 10-20  $\mu$ L 终体积, 轻轻吹打混匀细胞, 吸取细胞悬液滴加在载玻片上, 轻轻盖上盖玻片即可在显微镜下观察拍照。

注: 该 Caspase 4 Substrates(Green)可兼容大多数不含醛基的 PH 中性的基础培养基, 若部分细胞基础培养基成分较为特殊, 导致染色后背景较高, 可使用 PBS 配制染色液进行染色, 并在染色后使用 PBS 浸洗 3 次后再观察拍照。

该 Caspase 4 Substrates(Green)的细胞毒性较低, 可在加入凋亡诱导试剂后 1-3h 内同时加入 Caspase 4 Substrates(Green), 进行录像或者定时拍照, 观测特定时间内的 caspase 4 酶活性的实时动态变化。

## 结果展示



**control group:** Jurkat cells were cultured without drug administration;

**Test group 1:** Jurkat cells were cultured with 1 $\mu$ M Staurosporine for 3h;

**Test group 2:** Jurkat cells were pretreated with 100  $\mu$ M Z-VAD-FMK for 1h, and then cultured with 1 $\mu$ M Staurosporine for 3h;

图 1: Jurkat 细胞用 Caspase 4 Substrates(Green)染色后, 流式细胞仪检测分析。

## 注意事项

1. 本产品仅限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。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. Caspase 4 Substrates(Green)(1mM)建议分装后密封避光保存, 尽量在 6 个月内使用完毕, 避免反复冻融。
4. 细胞染色后可在室温下用 2-4% 多聚甲醛固定 15-30 min, 固定时间过久可能会导致背景信号增加。
5. 用 THP-1、RAW264.7 等疏松贴壁细胞检测细胞焦亡实验时, 需收集悬浮细胞和贴壁细胞进行检测。
6. 本产品未经活体组织染色验证, 可检测活细胞中的 caspase 4 酶活性, 不可用于固定后的细胞的检测。
7. 离心机升速和降速过高会引起细胞的损失, 建议调整升速不大于 3, 降速不大于 2, 即  $Acc \leq 3$ ,  $Dec \leq 2$ 。