

## Caspase 3/7 and PI Double Staining Kit

Cat. No: E-CK-A832

Size: 20 Assays/100 Assays

产品编号	产品名称	20 Assays	100 Assays	Storage
E-CK-A483	Caspase 3/7 Substrates (Green) (1mM)	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L	2~8°C, shading light
E-CK-A165	Propidium Iodide (PI) Solution (750 $\mu$ M)	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L×2	2~8°C, shading light
	说明书		一份	

### 保存条件

2~8°C避光保存 1 年。

### 实验原理

Elabscience®自主研发的 Caspase 3/7 and PI Double Staining Kit 可用于悬浮细胞和贴壁细胞的凋亡检测。

Caspase 3/7 Substrates(Green)采用新型的具有细胞膜通透性的 Caspase 3/7 绿色荧光底物, 可实时检测活细胞中 Caspase 3/7 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。

凋亡晚期或坏死细胞的细胞膜丧失完整性, 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 可进入凋亡晚期及坏死细胞的细胞膜, 与双链 DNA 特异性结合并产生强烈的红色荧光, 与 Caspase 3/7 Substrates 搭配使用, 可区分处于不同凋亡时期的细胞。DAPI 可进入凋亡晚期或坏死细胞的细胞膜, 和 Caspase 3/7 Substrates(Green) 共同染色, 可同时区分晚凋细胞、坏死细胞以及细胞凋亡周期中 caspase 3/7 酶的活性。

### 检测样本类型

- √贴壁细胞
- √悬浮细胞

### 自备试剂及仪器

#### 1) 试剂

PBS 缓冲液、细胞培养基

#### 2) 仪器

流式细胞仪、荧光显微镜

### 试剂准备

提前取出避光保存的 Caspase 3/7 Substrates (Green)和 Propidium Iodide (PI) Solution (750  $\mu$ M), 室温解冻后, 涡旋混匀。

## 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  $1\sim5\times 10^5$  个细胞加入 200  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，加入 1  $\mu\text{L}$  Caspase 3/7 Substrates (Green)，轻轻吹打混匀，37°C 避光孵育 20~30 min。
- (3) 直接加入 0.2  $\mu\text{L}$  Propidium Iodide (PI) Solution (750  $\mu\text{M}$ )，室温避光孵育 5~10 min。
- (4) 孵育完成后，无需洗涤，可以直接使用流式细胞仪进行检测。

注：流式细胞仪检测时，Caspase 3/7 可用 FL1 或 FITC 检测通道，PI 可用 Percp/Cy5.5 通道或 PE 通道；染色后的细胞注意避光，置于 4°C 冰箱或冰浴，并在 1h 内上机检测，避免放置时间过久，活细胞的状态变差，引起实验条件外的异常凋亡情况。

### ➤ 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，去除 PBS，重复洗涤 1 次，吸除 PBS。
- (2) 使用基础培养基，按照 96 孔板每孔 100  $\mu\text{L}$  或 24 孔板每孔 200  $\mu\text{L}$  的比例按照下表配制足量的 Caspase 3/7 染色工作液，轻轻吹打混匀。

组分	基础培养基	Caspase 3/7 Substrates (Green) (1 mM)
Caspase 3/7 染色工作液 200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Caspase 3/7 染色工作液 1 mL	1000 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
Caspase 3/7 染色工作液 2 mL	2000 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$

- (3) 贴壁缓慢加入 Caspase 3/7 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 20~30 min。
- (4) 无需洗涤，直接加入 Propidium Iodide (PI) Solution (750  $\mu\text{M}$ )，使终浓度为 7.5  $\mu\text{M}$ ，即 200  $\mu\text{L}$  染色液中加入 2  $\mu\text{L}$  Propidium Iodide (PI) Solution (750  $\mu\text{M}$ )。
- (5) 轻轻晃动细胞培养皿，反复画十字混匀试剂，室温继续避光孵育 5 min。
- (6) 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 3/7 为绿色荧光，Ex/Em=490nm/535nm；PI 为红色荧光，Ex/Em=535nm/617nm)
- (7) 若是悬浮细胞，则收集细胞沉淀后，按照  $1\sim5\times 10^5$  个细胞加入 200  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，加入 1  $\mu\text{L}$  Caspase 3/7 Substrates (Green)，轻轻吹打混匀，37°C 避光孵育 20~30 min，直接加入 2  $\mu\text{L}$  Propidium Iodide (PI) Solution (750  $\mu\text{M}$ )，轻轻吹打混匀，室温继续避光孵育 5 min，无需洗涤，250g 离心 5 min，吸出部分上清，留取约 10~20  $\mu\text{L}$  上清终体积，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：PI 染色 DNA 为可逆的过程，染色后洗涤会剥离 PI 和 DNA 的结合，染色 PI 后无需洗涤可直接检测或显微镜观察。

染色后的细胞注意避光，置于 4°C 冰箱或冰浴，并在 1h 内拍照检测，避免放置时间过久，活细胞的状态变差，引起实验条件外的异常凋亡情况。

## 结果展示

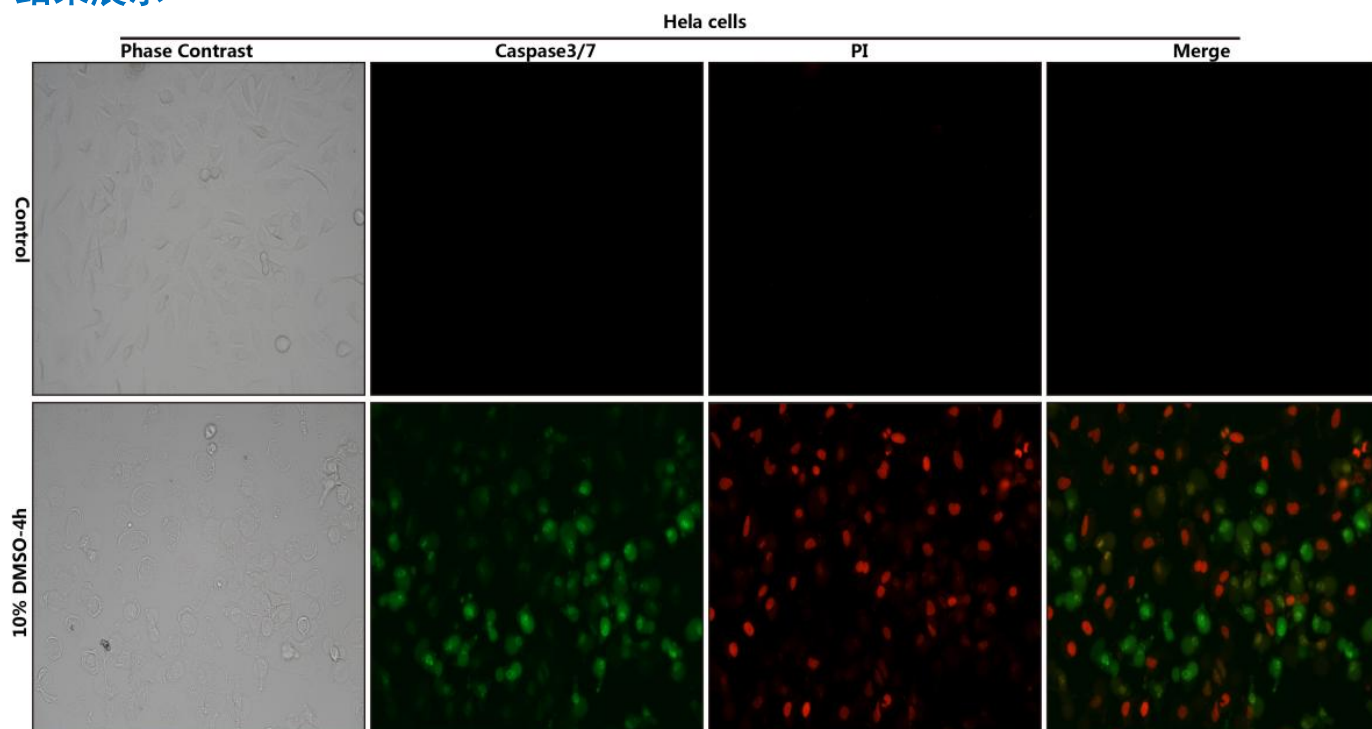


图 1: 10%DMSO 处理 4h 的 HeLa 细胞, 使用 Elabscience 的 Caspase 3/7 and PI Double Staining Kit 染色后使用荧光显微镜拍照。PI 染色结果为红色, 展示坏死或膜破损的细胞; Caspase 3/7 Substrates 染色为绿色, 展示发生凋亡并激活细胞内 caspase 3/7 酶活的凋亡细胞。

## 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. 该 Caspase 3/7 Substrates (Green) 荧光探针和 PI 共染色判断活细胞的凋亡进程时, 需要在活细胞状态染色并检测, 不能对细胞进行固定。
4. 本产品未进行过活体组织染色验证。
5. 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  $Acc \leq 3$ ,  $Dec \leq 2$ 。
6. 流式细胞仪检测时 PI 可使用 PE 或 Percp/Cy5.5 通道。