

Caspase 3/7 and DAPI Double Staining Kit

Cat. No: E-CK-A833

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 μ L	100 μ L	2~8°C, shading light
E-CK-A163	DAPI Reagent (25 μ g/mL) 说明书	250 μ L	500 μ L 一份	2~8°C, shading light

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 DAPI Double Staining Kit 可用于悬浮细胞和贴壁细胞的凋亡检测。

Caspase 3/7 Substrates 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。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。

凋亡晚期或坏死细胞的细胞膜丧失完整性，4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐 (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, DAPI) 可进入凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜，与双链 DNA 特异性结合并产生强烈的蓝色荧光，与 Caspase 3/7 Substrates (Green) 搭配使用，可同时区分坏死细胞及细胞凋亡周期中 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 DAPI Reagent (25 μ g/mL)，室温解冻后，涡旋混匀。

For Research Use Only

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 μL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 加入 1 μL Caspase 3/7 Substrates (Green), 轻轻吹打混匀, 37°C 避光孵育 20~30 min。
- (3) 无需洗涤, 直接加入 2 μL DAPI Reagent (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 轻轻吹打混匀, 室温继续避光孵育 3~5 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, DAPI 可用 Pacific Blue 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; DAPI 染色时间过久会导致背景增加, 尽量不超过 15min, 上机检测前加入即可。

➤ 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 μL 或 24 孔板每孔 200 μL 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 μL)	200 μL	1 μL
Caspase 3/7 染色工作液 (1 mL)	1000 μL	5 μL
Caspase 3/7 染色工作液 (2 mL)	2000 μL	10 μL

- (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 DAPI Reagent (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 使终浓度为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 即 200 μL 细胞培养液中加入 2 μL DAPI Reagent (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
- (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 3~5 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; DAPI 为蓝色荧光, Ex/Em=364nm/454nm)
- (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 μL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 加入 1 μL 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 μL DAPI Reagent (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 轻轻吹打混匀, 室温继续避光孵育 3~5 min, 无需洗涤, 250 g 离心 5 min, 吸出部分上清, 留取约 10~20 μL 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: 染色后的细胞注意避光, 置于 4°C 冰箱或冰浴, 并在 1h 内观拍照检测, 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; DAPI 染色时间过久会导致背景增加, 尽量不超过 15 min, 若拍照时间过久, DAPI 背景较高, 可将 DAPI Reagent (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 稀释 200~500 倍后再染色, 或染色后使用基础培养基浸润洗涤后再拍照观察。

结果展示

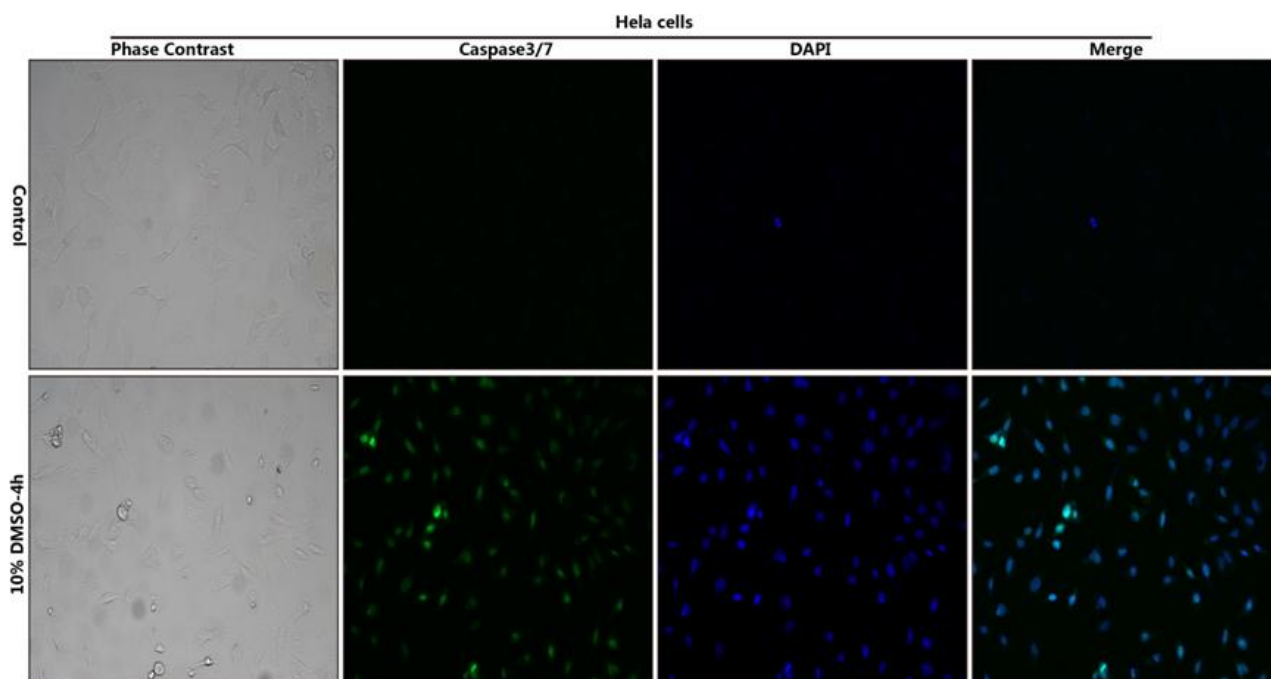


图 1: 10%DMSO 处理 4h 的 HeLa 细胞, 使用 Elabscience 的 Caspase 3/7 and DAPI Double Staining Kit 染色后使用荧光显微镜拍照, DAPI 染色结果为蓝色, 展示坏死或膜破损的细胞; Caspase 3/7 Substrates 染色细胞为绿色, 展示发生凋亡并激活 caspase 3/7 酶活的凋亡细胞。

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 DAPI 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. 该产品尚未进行过活体检测验证。
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. DAPI 染色时间应小于 15 min, 否则会引起荧光背景值升高。如后续显微镜摄影时间较长(大于 1 小时), 可将 DAPI 稀释 200~500 倍后再染色。如果使用稀释的 DAPI 溶液, 染色时间可适当延长至 1~2 h。另外, 为避免高荧光背景, DAPI 染色后, 可用 PBS 洗涤后在显微镜下观察或拍照。