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 μL	100 μL	2~8℃, shading light
E-CK-A163	DAPI Reagent (25μg/mL)	250 μL	500 μL	2-8℃/-20℃, shading light
	说明书		一份	

保存条件

2~8℃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 (25μg/mL)，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 1~5×10^5 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℃避光孵育 20~30 min。

（3） 无需洗涤，直接加入 2 μL DAPI Reagent (25μg/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℃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℃避光孵育 20~30 min。

（4） 无需洗涤，直接加入 DAPI Reagent (25μg/mL)，使终浓度为 0.25 μg/mL，即 200 μL 细胞培养液中加入 2 μL DAPI Reagent (25μg/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 1~5×10^5 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℃避光孵育 20~30 min，直接加入 2 μL DAPI Reagent (25μg/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℃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 μg/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

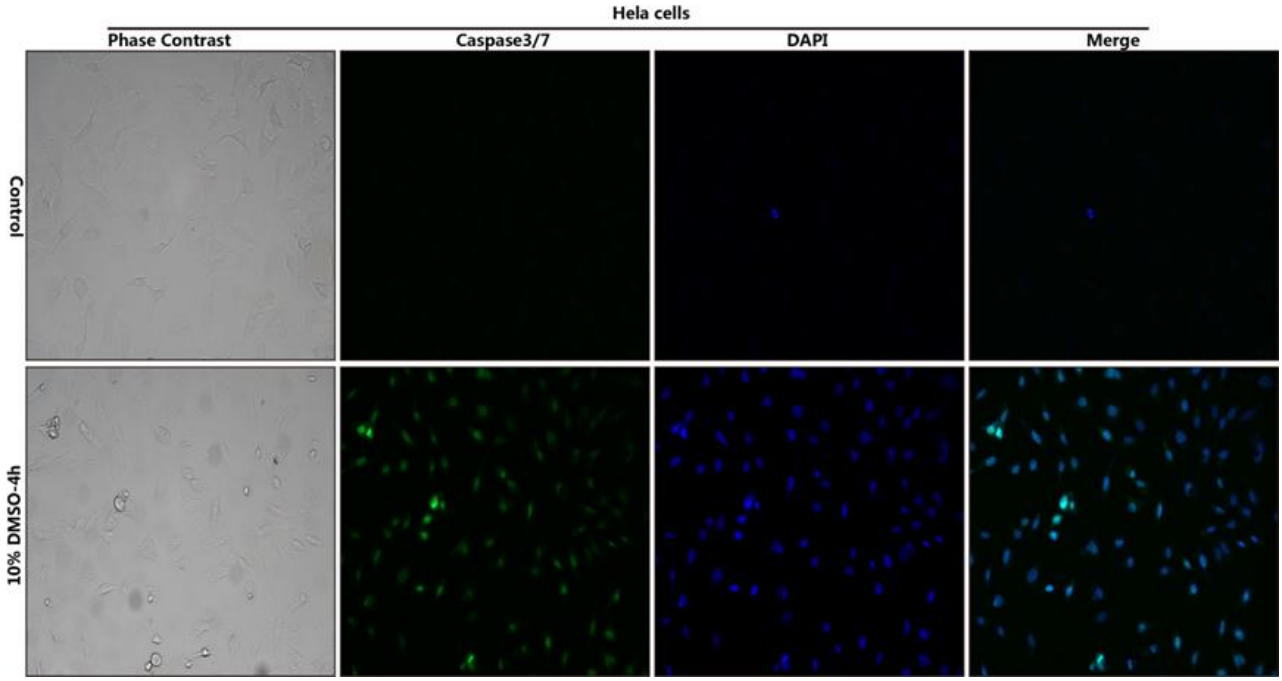

图 1：10%DMSO 处理 4h 的 Hela 细胞，使用 Elabscience 的 Caspase 3/7 and DAPI Double Staining Kit 染色后使用荧光显微镜拍照，DAPI 染色结果为蓝色，展示坏死或膜破损的细胞；Caspase 3/7 Substrates 染色细胞为绿色，展示发生凋亡并激活 caspase 3/7 酶活的凋亡细胞。

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≦3，Dec≦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。