

## 活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1073S	活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	20次
C1073M	活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒	50次

### 产品简介:

- 碧云天生产的活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒(Caspase-3 Activity and Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit for Live Cell)是基于线粒体膜电位依赖性的远红外荧光探针Mito-Tracker Deep Red 633联合Caspase-3酶的荧光底物GreenNuc™ Caspase-3 Substrate检测线粒体膜电位以及凋亡细胞内Caspase-3酶活性的试剂盒。本试剂盒适用于荧光显微镜、荧光酶标仪或流式细胞仪等荧光检测设备。
- Caspase (cysteine-dependent aspartate-specific proteases)的全称为天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶，存在于细胞质中，主要利用半胱氨酸(cysteine)侧链选择性地高效切割含有天冬氨酸(aspartate)的多肽底物，在介导细胞凋亡(apoptosis)过程中起重要作用，并参与细胞的炎症、生长和分化等过程。Caspase-3也称CPP32、Yama或apopain，属于caspase家族的CED-3亚家族(CED-3 subfamily)，是哺乳动物细胞中研究最多的一个caspase。Caspase-3是细胞凋亡过程中的一个关键酶，可以直接特异性切割多种底物，包括PARP (poly ADP-ribose polymerase)、ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease)、proCaspase-6、7和9、gelsolin和fodrin等。这些由Caspase-3介导的蛋白剪切是细胞凋亡分子机制的重要组成部分。同时Caspase-3还参与细胞核凋亡过程，如染色质固缩(chromatin condensation)，DNA片段化(DNA fragmentation)等。另外，Caspase-3对凋亡过程中的细胞起泡(cell blebbing)也起到了关键作用。
- 本试剂盒基于荧光底物GreenNuc™ Caspase-3 Substrate检测Caspase-3酶活性的原理如下。底物GreenNuc™ Caspase-3 Substrate为偶联DNA绿色荧光染料的多肽DEVD，该底物中的DEVD是caspase 3/7的识别序列，并带有大量负电荷。这些负电荷和DNA带有的负电荷相互排斥，使底物中的DNA绿色荧光染料不能结合DNA，也就不能被激发产生绿色荧光。最初没有荧光的底物穿过细胞膜进入细胞质，在凋亡细胞中被Caspase-3/7识别并剪切，释放出活化的DNA绿色荧光染料分子。活化的DNA绿色荧光染料分子迁移进入细胞核，与DNA结合后，形成GreenNuc™-DNA复合物，就可以被激发而产生明亮的绿色荧光。
- 本试剂盒中Mito-Tracker Deep Red 633，也称MitoTracker™ Deep Red FM检测线粒体膜电位的原理如下。Mito-Tracker Deep Red 633是一种线粒体远红外荧光探针，其在线粒体内的积累依赖于线粒体膜电位(与JC-1、TMRE和Rhodamine 123相同)。正常细胞中，Mito-Tracker Deep Red 633对线粒体进行特异性染色，呈明亮的远红外荧光；细胞发生凋亡时，线粒体膜电位下降，染料在线粒体内的积累减少，荧光减弱或消失。
- 本试剂盒通过检测GreenNuc™-DNA复合物的绿色荧光(Ex/Em=500/530nm)和依赖于线粒体膜电位的Mito-Tracker Deep Red 633的远红外荧光(Ex/Em=622/648nm)，显示细胞的Caspase-3酶活性以及线粒体膜电位，从而判定细胞凋亡的发生。GreenNuc™-DNA复合物和Mito-Tracker Deep Red 633的激发光谱和发射光谱参考图1。

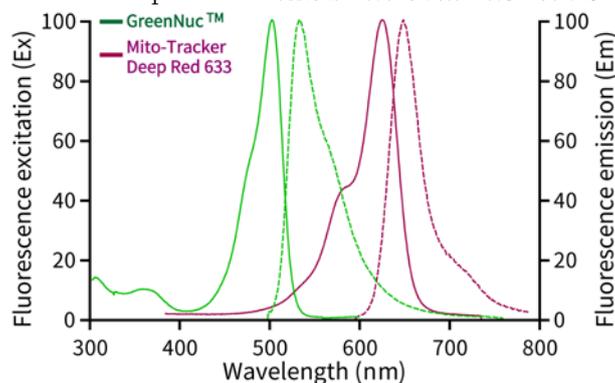


图1. GreenNuc™-DNA复合物和Mito-Tracker Deep Red 633的激发光谱与发射光谱。

- 本试剂盒可以实时监测凋亡情况。**传统的Caspase活性检测试剂盒，通常需要裂解细胞或组织样品后进行显色或荧光检测；通过Western检测Caspase本身的和剪切后的蛋白表达情况，也只能检测Caspase的表达情况，从一定程度上反映酶活性。基于荧光标记的Caspase抑制剂的检测技术(fluorochrome-labeled inhibitors of caspases, FLICA)可以进入活细胞检测Caspase活性，但其荧光探针本身就是不可逆的Caspase抑制剂，所以无法在活细胞中实时监测Caspase的活力。而本试剂盒中提供的荧光底物GreenNuc™ Caspase-3 Substrate对细胞活性没有明显的抑制作用，不影响Caspase的表达，不抑制细胞的凋亡过程，能实时监测细胞凋亡。
- 本试剂盒功能强大。**使用本试剂盒检测Caspase-3活性的同时，还能够实时监测细胞内线粒体膜电位的变化。

- **本试剂盒使用便捷。**本试剂盒中检测试剂配制后直接加入细胞中，孵育20-30分钟后即可直接用于荧光显微镜、流式细胞仪或荧光酶标仪检测等检测系统进行定性或定量检测。使用本试剂盒检测正常细胞、凋亡细胞Caspase-3活性以及线粒体膜电位的效果参考图2。

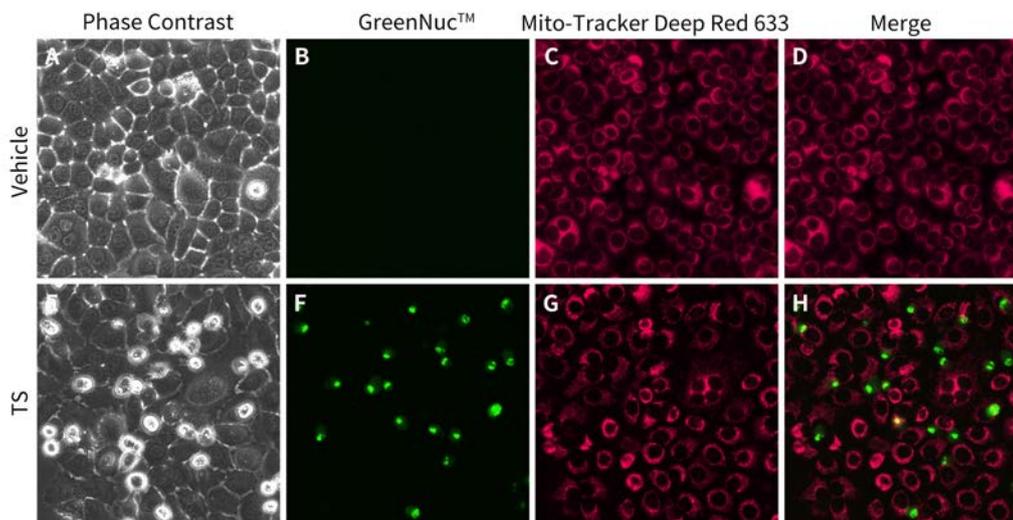


图2. 活细胞Caspase-3活性与线粒体膜电位检测试剂盒(C1073)检测Caspase-3活性以及线粒体膜电位的效果图。正常培养的BGC-823细胞(人胃癌细胞)在明场下的形态见图A，正常细胞内线粒体被Mito-Tracker Deep Red 633染成洋红色荧光(伪彩色)(图C)。经TS处理3h的BGC-823细胞在明场下的形态见图E。凋亡细胞的细胞核呈绿色荧光(图F)，线粒体呈洋红色荧光(伪彩色)(图G)。TS是由TNF $\alpha$ 、SM-164组成的细胞凋亡诱导试剂(C0006S)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异，本图仅供参考。

- 本试剂盒小包装C1073S和中包装C1073M用于流式细胞仪，每个样品使用200 $\mu$ l的检测工作液，可以分别进行20次和50次检测；用于96孔板每孔检测体系的体积为100 $\mu$ l时可以分别可以检测40次和100次，检测体系体积为200 $\mu$ l时可以分别可以检测20次和50次。实际检测次数会因为检测体系和使用的底物浓度而有所不同。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C1073S-1	GreenNuc™ Caspase-3 Substrate	20 $\mu$ l
C1073S-2	Mito-Tracker Deep Red 633	20 $\mu$ l
C1073S-3	检测缓冲液	5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C1073M-1	GreenNuc™ Caspase-3 Substrate	50 $\mu$ l
C1073M-2	Mito-Tracker Deep Red 633	50 $\mu$ l
C1073M-3	检测缓冲液	15ml
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存，一年有效。C1073-1 GreenNuc™ Caspase-3 Substrate和C1073-2 Mito-Tracker Deep Red 633须避光保存。

#### 注意事项：

- 避免微生物污染，如有细菌或真菌污染，会严重影响检测效果。
- 染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
- GreenNuc™ Caspase-3 Substrate不是很稳定，应尽量避免反复冻融(一般不要超过三次)。
- 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。
- 仅限于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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明：

##### 1. 检测工作液的配制：

对于6、12、24、96孔板，每孔所需的检测工作液的用量分别为0.5~1ml、200~500 $\mu$ l、100~200 $\mu$ l和50~100 $\mu$ l。根据样品数量，计算所需检测工作液的体积。以12孔板每孔200 $\mu$ l染色工作液的体系为例，参考下表配制检测工作液。

样品数	1	5	10	20
GreenNuc™ Caspase-3 Substrate (1mM)	1μl	5μl	10μl	20μl
Mito-Tracker Deep Red 633	1μl	5μl	10μl	20μl
检测缓冲液	198μl	990ml	1.98ml	3.96ml
检测工作液体积	200μl	1ml	2ml	4ml

**注1:** 检测工作液需用现配, 并一次性使用完毕, 不可冻存。

**注2:** 检测工作液中的GreenNuc™ Caspase-3 Substrate和Mito-Tracker Deep Red 633的最终浓度需根据不同细胞系和实验体系通过预实验进行优化, 上表中的用量为推荐用量。

**注3:** 本试剂盒中提供的检测缓冲液在一段时间内可以维持细胞的正常状态, 并给细胞提供一定的营养, 效果通常比PBS或HBSS更好, 也可以用其它合适的溶液, 如无血清培养液代替。

## 2. 悬浮细胞的检测:

- 在凋亡诱导结束后, 1000×g室温离心5分钟, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。取5-20万重悬的细胞, 1000×g离心5分钟, 弃上清。**注:** PBS重悬的过程主要起到洗涤细胞的作用。
- 加入200μl检测工作液重悬细胞, 并轻轻混匀。
- 室温(20-25℃)避光孵育20-30分钟, 孵育完毕后置于冰浴中。**注:** 可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以适当重悬细胞2-3次以改善染色效果。
- 随即进行流式细胞仪检测, GreenNuc™-DNA复合物为绿色荧光(Ex/Em=500/530nm), Mito-Tracker Deep Red 633为远红外荧光(Ex/Em=622/648nm)。如果用于荧光显微镜下检测, 1000×g离心5分钟, 收集细胞, 用50-100μl检测缓冲液轻轻重悬细胞, 涂片后, 荧光显微镜下观察。注意: 细胞在染色后须尽快完成检测, 通常宜在1小时之内完成检测。

## 3. 贴壁细胞的流式检测:

- 在凋亡诱导结束后, 把细胞培养液吸出至一合适离心管内, PBS洗涤细胞一次, 加入适量胰酶细胞消化液(可含有EDTA)消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞脱落为止, 吸除胰酶细胞消化液, 避免胰酶的过度消化。
- 加入步骤3a中收集的细胞培养液, 稍混匀, 转移到离心管内, 1000×g离心5分钟, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。**注:** 加入步骤3a中的细胞培养液一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞, 另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶。
- 取5-20万重悬的细胞, 1000×g离心5分钟, 弃上清。
- 加入200μl检测工作液重悬, 轻轻混匀。
- 室温(20-25℃)避光孵育20-30分钟, 孵育完毕后置于冰浴中。**注:** 可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以适当重悬细胞2-3次以改善标记效果。
- 随即进行流式细胞仪检测, GreenNuc™-DNA为绿色荧光(Ex/Em=500/530nm), Mito-Tracker Deep Red 633为远红外荧光(Ex/Em=622/648nm)。如果用于荧光显微镜下检测, 1000×g离心5分钟, 收集细胞, 用50-100μl检测缓冲液轻轻重悬细胞, 涂片后, 荧光显微镜下观察。注意: 细胞在染色后须尽快完成检测, 通常宜在1小时之内完成检测。

## 4. 贴壁细胞的原位荧光检测:

本方法的优点是可以原位观察细胞凋亡, 但部分凋亡细胞由于不贴壁而检测不到。

- 选做: 在凋亡诱导结束后, 对培养于24孔板、48孔板或96孔板内的细胞进行离心, 1000×g离心5分钟。
- 吸除细胞培养液, 加入PBS洗涤一次。
- 加入200μl检测缓冲液, 轻轻混匀。
- 室温(20-25℃)避光孵育20-30分钟。
- 随即在荧光显微镜下观察, GreenNuc™-DNA为绿色荧光(Ex/Em=500/530nm), Mito-Tracker Deep Red 633为远红外荧光(Ex/Em=622/648nm)。注意: 细胞在染色后须尽快完成检测, 通常宜在1小时之内完成检测。

Version 2020.07.10