

Caspase 3/7 和 PI 凋亡双染试剂盒

货号: KTA3029

规格: 20 T/100 T

批号: 见产品标签

	应用实验: 流式细胞术/荧光显微镜
	保质期: -20℃, 避光保存 12 个月

01 背景与原理

Caspase 3/7 活性细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）是通过测量 Caspase 3/7 的活性而用于细胞凋亡检测的。因为 Caspase 3 (CPP32/ Apopain)在细胞凋亡的起始过程中发挥着重要作用，因此其作为细胞凋亡指示剂广泛地被大家所接受。Caspase 3 具有特异性的底物多肽识别序列，即天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸（DEVD）。

Caspase 3/7 和 PI 凋亡双染试剂盒是通过测量 Caspase 3/7 的活性和细胞膜完整性而用于细胞凋亡检测的。Caspase 3/7 Green 采用 Caspase 3/7 识别序列(DEVD)偶联到高亲和力的 DNA 荧光染料，具有细胞膜通透性，能够穿透细胞膜进入细胞质中，Caspase 3/7 Green 试剂本身无荧光，并与 DNA 具有电荷排斥效应；当细胞发生凋亡时，Caspase 3/7 Green 作为底物被激活的 Caspase 3/7 切割后释放出高亲和力的 DNA 染料，与 DNA 结合后产生强荧光（Ex /Em : 488nm/525 nm，流式推荐 FITC 通道）。当细胞进入凋亡晚期或坏死时细胞膜完整性丧失，碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）可进入凋亡晚期和坏死细胞的细胞中，与双链 DNA 特异性结合并产生强烈的红色荧光（Ex /Em : 535nm /617 nm），与 Caspase 3/7 Green 搭配使用，可同时区分坏死细胞及凋亡细胞中 Caspase 3/7 酶的活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	20 T	100 T	
Caspase 3/7 Green	20 μL	100 μL	-20℃，避光保存
PI	40 μL	200 μL	-20℃，避光保存

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	流式细胞仪/荧光显微镜	FITC 通道和 PE 通道
耗材	24 孔细胞板	荧光显微镜检测
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS, pH 7.4）	清洗和染色
其他	离心机、移液枪	

04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Caspase 3/7 Green	即用型	避光保存；稀释后不可保存
PI	即用型	避光保存；稀释后不可保存

05-2 实验步骤

实验设计

选择合适的方法诱导细胞凋亡，同时设置无诱导的对照组。流式检测时非常推荐做阳性单染管及阴性对照，检测时调整合适电压，对后期分群非常有帮助。

1. 流式细胞仪分析

(1) 收集细胞，4℃，300g 离心 5min 收集 1-5×10⁵ 细胞，用冰预冷的 PBS 洗涤 2 次。

注意：贴壁细胞使用胰酶消化后离心收集细胞，如果消化时间过长，易造成细胞膜结构损伤而出现细胞坏死的假阳性，所以需控制胰酶消化时间（推荐使用温和消化液）。

(2) 用 500 μL PBS 重悬细胞。

(3) 每 500 μL 细胞悬液中加入 1 μL Caspase 3/7 Green 染色液和 1 μL PI（PI 染色一般只需 5min,也可以在染色快结束时补加），轻柔混匀。

注意：PI 的用量可以根据实际情况进行调整，同时非常推荐做阳性单染管。

(4) 室温避光孵育 20-30 min。

(5) 孵育结束后置于冰上。染色后 30 min 内用流式细胞仪检测。

2. 荧光显微镜分析

A. 对于悬浮细胞：

(1) 按照步骤流式细胞分析步骤制样。

(2) 将染色好的细胞悬浮置于玻片上，用盖玻片盖住细胞。尽快使用适当的滤镜通过荧光显微镜分析细胞。

B. 对于贴壁细胞，按照以下操作步骤（以 24 孔板为例）：

(1) 细胞接种于爬片或腔室载玻片上，培养细胞。

(2) 通过所需方法诱导细胞凋亡，同时设置无诱导的对照组。

(3) 除去培养基，用 PBS 洗涤细胞 2 次。

(4) 准备工作液：每 200 μL PBS 添加 1 μL Caspase 3/7 Green 和 1 μL PI，轻柔混匀。

- (5) 在每孔中加入 200 μ L 配好的工作液，室温避光孵育 30 min。
- (6)使用合适的滤光片在荧光显微镜下分析细胞。
- 注意：荧光显微镜拍照时绿色荧光容易猝灭，推荐染色时染料浓度较高按 1:200 稀释,另拍照时先用白光找到视野后再用荧光立即拍照保存。

06 结果展示

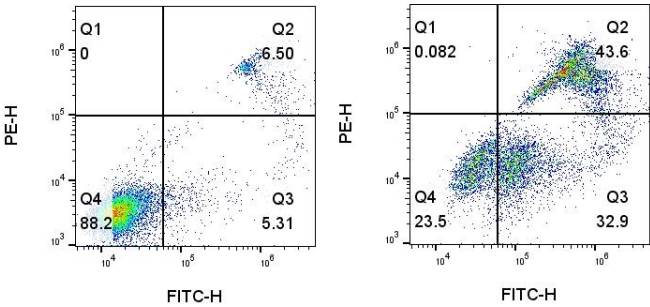


Figure 1. Hela 细胞用 DMSO（左）或 A+B (1:2000)（右）处理 16 h 后用 Caspase 3/7 和 PI 凋亡双染试剂盒进行染色。染色样本用流式细胞仪进行检测，PI 用 PE 通道进行检测; Caspase 3/7 Green 用 FITC 进行检测。细胞分群主要分为活细胞（Q4），凋亡（Q3）和坏死（Q2），诱导后，凋亡和坏死细胞明显增加。

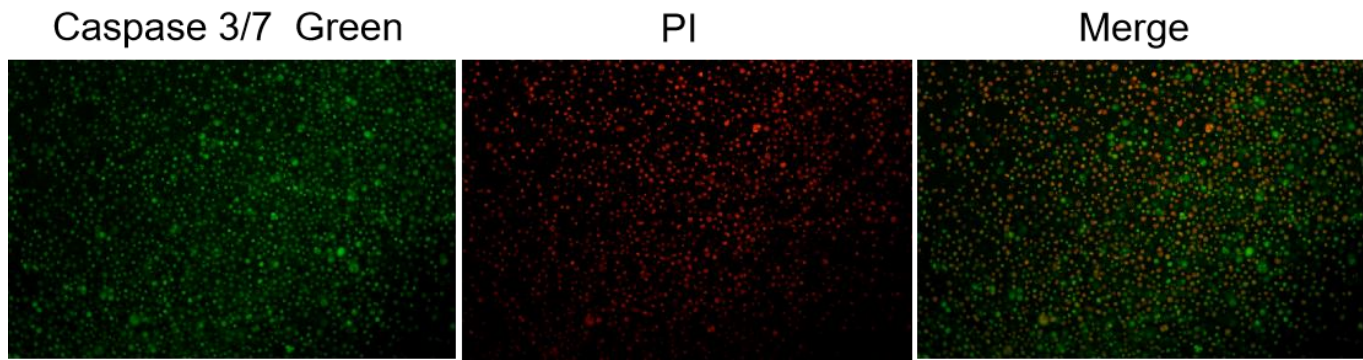


Figure 2. Jurkat 细胞用诱导剂 A+B (1:2000)诱导 16 h,然后经 Caspase 3/7 和 PI 凋亡双染试剂盒进行染色，用荧光显微镜检测。

07 FAQ

1. 流式检测时 PI 的信号过强的原因？

PI 具有细胞毒性，染色浓度过高或染色时间过长都会导致信号过高，一般 PI 约 5 min 染色即可，染色后样本不要保存太久，建议及时上机，以及设置单阳管进行电压和补偿调节。
2. 流式分群不明显，无法圈门？

建议设置严格的对照，比如阴性，单阳管，检测时调整好合适的电压，建议对流式实验比较熟悉的人来操作，另外我们也试过一些细胞系流式分群确实不明显（但荧光显微镜可以），这可能跟细胞特性有关。

08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA0002	Annexin V-AbFluor™ 488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒
KTA3028	Caspase 3/7 和 DAPI 凋亡双染试剂盒
KTA4001	线粒体膜电位分析试剂盒（JC-1 法）