Caspase 3/7 活性细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

货号: KTA3027　　规格：50 T/100 T　　批号：见产品标签

	应用实验：流式细胞术/荧光显微镜/荧光酶标仪
	荧光激发/发射波长：Caspase 3/7 Green: Ex/Em=488/525 nm
	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)。

本试剂盒中 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），用于 Caspase-3/7 活性和细胞凋亡的检测。本试剂盒可以用流式细胞仪、荧光酶标仪和荧光显微镜对细胞 Caspase 3/7 活性和凋亡状态进行检测。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	50 T	100 T	
Caspase 3/7 Green	50 μL	100 μL	-20℃，避光保存
Z-VAD (OMe)-FMK	10 μL	20 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/荧光酶标仪	FITC 通道（Ex/Em: 488nm/525 nm）
耗材	24 孔细胞板；96 孔全黑板	荧光显微镜检测；荧光酶标仪检测
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
Z-VAD (OMe)-FMK	即用型；10mM	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。(本试剂盒中提供一定量的抑制剂 Z-VAD(OMe)-FMK,可以根据需要在诱导的同时增加抑制剂组。尽管 Z-VAD(OMe)-FMK 是一种广泛认可的 Caspase 抑制剂,但在具体实验过程中不同的凋亡诱导剂及不同细胞的凋亡, Z-VAD (OMe)-FMK 对其抑制效果不尽相同，需要研究人员根据实验目的自行摸索药物浓度和实验方法。本试剂在开发过程中用喜树碱和 Raptinal 对 Hela 和 Jurkat 细胞诱导凋亡并加抑制剂都有明显的抑制作用。另外除了 Z-VAD (OMe)-FMK，也可选择其它的 Caspase 抑制剂比如 Ac-DEVD-CHO,需要根据实验目的进行筛选。)

A. 流式细胞仪分析

1. 流式细胞仪分析和酶标仪检测

(1) 收集细胞，4℃，300 g 离心 5min 收集 1-5×10^5 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，轻柔混匀。

(4) 室温避光孵育 20-30min。

(5) 孵育结束后置于冰上。染色后 30 min 内用流式细胞仪（FITC 通道）检测或接种到 96 孔全黑板用荧光酶标仪（Ex /Em : 488 nm /525 nm）进行检测。

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，轻柔混匀。

(5) 在每孔中加入 200 μL 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

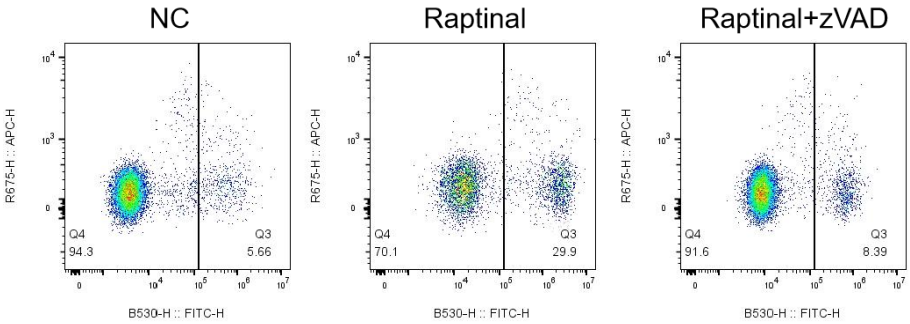


Figure 1. Jurkat 细胞用 Raptinal（5μM）诱导 4h 及不加或加 zVAD (10 μM)，然后经 Caspase 3/7 活性细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）进行染色，用流式细胞仪进行检测（FITC 通道）。可以看到单独 Raptinal 诱导组的凋亡细胞亚群(Q3)比例明显增加（从 5.66% 增加到 29.9%），而在增加抑制剂后凋亡比例明显下降（8.39%）。

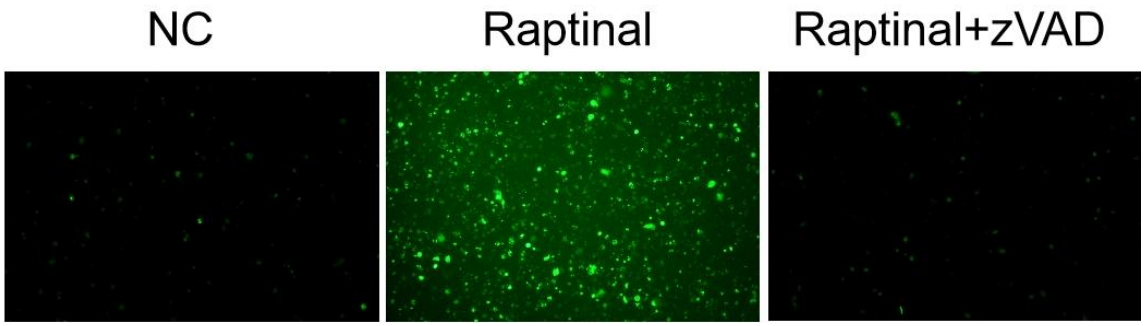


Figure 2. Jurkat 细胞用 Raptinal（5 μM）诱导 4h 及不加或加 zVAD (10 μM)，然后经 Caspase 3/7 活性细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）进行染色，用荧光显微镜检测。可以看到单独 Raptinal 诱导组的荧光强度明亮，而在增加抑制剂后荧光信号明显下降。

07 FAQ

1. 为什么流式染色时染料浓度降低及时间可以缩短?

流式细胞仪的检测灵敏度较高，检测是瞬时的，不存在荧光猝灭情况，而对于荧光酶显微镜，荧光信号太低，需要延长曝光时间，易发生荧光猝灭，导致检测效果不加。

2. 该试剂盒可以和 PI 等膜不透性的其它试剂一起染色用于凋亡检测吗?

可以，但要注意分群不等同于 Annexin V/PI 组合，Caspase 3/7 Green 本质上是检测 Caspase 3/7 的活性，所以其与 PI 的组合跟 Annexin V/PI 的检测分群存在差别。

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
KTA2011	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）
KTA4001	线粒体膜电位分析试剂盒（JC-1 法）