



Caspase 1 活细胞凋亡检测试剂盒 (绿色)

产品描述

活细胞凋亡检测试剂盒基于半胱天冬酶的荧光抑制剂。这些抑制剂具有细胞渗透性和非细胞毒性。一旦进入细胞, 半胱天冬酶抑制剂与活性半胱天冬酶共价结合。Caspase-1 主要参与促炎细胞因子的激活和细胞凋亡过程, 已经证明胱天蛋白酶 1 对肽序列 Tyr-Val-Ala-Asp (YVAD) 具有底物选择性。本试剂盒使用 FAM-YVAD-FMK 作为半胱天冬酶 1 活性的荧光指示剂。FAM-YVAD-FMK 在凋亡细胞中不可逆地结合活化的半胱天冬酶 1。一旦与半胱天冬酶 1 结合, 荧光试剂保留在细胞内, 结合抑制胱天蛋白酶 1 但不会阻止细胞凋亡的进行, 有多种参数可用于监测细胞凋亡。

本试剂盒旨在通过测量活细胞中的 caspase 1 活化来检测细胞凋亡, 用于定量凋亡细胞中活化的半胱天冬酶 1 活性, 或用于筛选半胱天冬酶 1 抑制剂。绿色标记试剂 FAM-YVAD-FMK 允许通过荧光显微镜, 流式细胞仪或荧光酶标仪直接检测凋亡细胞中活化的半胱天冬酶 1。本试剂盒为所有必需组分提供优化的分析方案。

订购信息

产品名称	货号	规格
Caspase 1 活细胞凋亡检测试剂盒 (绿色)	AC12L062	25 T

产品组分

组分	规格
A. FAM-YVAD-FMK	1 vial
B. Washing Buffer	100 mL
C. 500X Propidium Iodide	100 μ L
D. 500X Hoechst Stain	100 μ L

运输与保存

蓝冰运输。-20°C 保存, 有效期 12 个月。

产品参数

Ex(nm): 493 Em(nm): 517

实验方案

1. 用密度为 5×10^5 到 2×10^6 个细胞/ mL 的测试化合物制备细胞。
2. 将 FAM-YVAD-FMK 以 1: 150 的比例加入到细胞溶液中。
3. 在室温下孵育 1 h。
4. 将细胞沉淀, 用缓冲液或生长培养基洗涤并重悬细胞。
5. 在 Ex / Em = 490 / 525nm 处分析细胞。【注】: 使用前将所有部件在室温下解冻。

使用方法



1. 根据您的特异性诱导方案, 将细胞培养至最适于细胞凋亡诱导的密度, 但不超过 2×10^6 个细胞/ mL。同时, 对于每种标记条件, 以与诱导群体相同的密度培养非诱导的阴性对照细胞群。以下是一些诱导悬浮培养细胞凋亡的例子:

例 1: 用 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 喜树碱处理 Jurkat 细胞 3 h;

例 2: 用 $1\mu\text{M}$ 星形孢菌素处理 Jurkat 细胞 3 h;

例 3: 用 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 喜树碱处理 HL-60 细胞 4 h;

例 4: 用 $1\mu\text{M}$ 星形孢菌素处理 HL-60 细胞 4 h。

【注】: 应对每个细胞系进行单独评估, 以确定诱导细胞凋亡的最佳细胞密度。

2. 通过向 FAM-YVAD-FMK (组分 A) 的小瓶中加入 $50\mu\text{L}$ DMSO 制备 150X FAM-YVAD-FMK DMSO 储备溶液。
3. 将 $150\times$ FAM-YVAD-FMK DMSO 储备溶液 (来自步骤 1) 以 1: 150 的比例添加到细胞溶液中, 并将细胞在 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中孵育 1 h。

注 1: 对于 FAM-YVAD-FMK 标记, 细胞可以浓缩至 $\sim 5 \times 10^6$ 个细胞/ mL。未使用的 150X FAM-YVAD-FMK DMSO 储备溶液应分为单次使用的等分试样并储存在 -20°C 。

注 2: 对于粘附细胞, 用 0.5mM EDTA 轻轻提起细胞以保持细胞完整, 并在用 FAM-YVAD-FMK 孵育之前用含血清的培养基洗涤细胞一次。

注 3: 适当的孵育时间取决于所用的细胞类型和细胞浓度。优化每个实验的孵育时间。

4. 将细胞以约 200g 旋转 5 min, 并用 1mL 洗涤缓冲液 (组分 B) 洗涤细胞 2 次。将细胞重悬于所需量的洗涤缓冲液中。

注 1: FAM-YVAD-FMK 是荧光的, 因此清除任何未结合的试剂以消除背景非常重要。

注 2: 对于分离的细胞, 应将细胞浓度调节至每个微量滴定板孔中 $2-5 \times 10^5$ 个细胞/ $100\mu\text{L}$ 等分试样, 用于步骤 6。

5. 如果需要, 用 DNA 染色标记细胞 (如用于死细胞的碘化丙锭, 或用于细胞核染色的整个群体的 Hoechst)。

6. 通过荧光显微镜, 流式细胞仪或荧光酶标仪在 $\text{Ex} / \text{Em} = 490 / 525\text{nm}$ 处检测荧光强度 (对于碘化丙锭, $\text{Ex} / \text{Em} = 535/635\text{nm}$; 对于 Hoechst 染料, $\text{Ex} / \text{Em} = 350 / 461$ 纳米)。

(1) 对于流式细胞仪, 使用 FL1 通道监测荧光强度 (FL2 通道用于碘化丙锭染色)。

(2) 用于荧光显微镜和荧光酶标仪。将 $100\mu\text{L}$ 细胞悬浮液置于 96 孔黑壁/微量滴定板透明底部的每个孔中。

【注】: 如果需要平衡细胞浓度, 调整诱导细胞的悬浮体积以接近非诱导细胞群的细胞密度。如果您的细胞治疗不会导致受刺激细胞群数量的显着损失, 则此调整步骤是可选的。

(3) 使用 FITC 通道在荧光显微镜下观察细胞 (用于碘化丙锭染色的 TRITC 通道, 用于 Hoechst 染色的 DAPI 通道)。

(4) 使用荧光酶标仪, 使用 $\text{Ex} / \text{Em} = 490 / 525\text{nm}$ (在 515nm 处截止) 底部读取模式监测荧光强度。

注意事项

1. 本产品仅限于科学实验研究使用, 不得用于临床诊断、治疗等领域。

相关产品推荐

EZ Trans 细胞转染试剂 (高效) (货号: AC04L092)

快速细胞冻存液 (无血清、无蛋白) (货号: AC05L033)