

Caspase-3 Activity Assay Kit

Caspase-3 活性检测试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL1212A	Caspase-3 活性检测试剂盒	20T
BL1212B	Caspase-3 活性检测试剂盒	100T

产品简介:

caspase-3 活性检测试剂盒(caspase-3 Activity Assay Kit)是采用分光光度法检测细胞或组织裂解液中 caspase-3 酶活性或纯化的 caspase-3 酶活性的试剂盒。

Caspase (Cysteine-requiring Aspartate Protease)是一个在细胞凋亡过程中起重要作用的蛋白酶家族。caspase-3 也称 CPP32、Yama 或 apopain,有时被写作 caspase-3 或 caspase 3,属于 caspase 家族的 CED-3 亚家族(CED-3 subfamily),是细胞凋亡过程中的一个关键酶。caspase-3 是哺乳动物细胞中研究最多的一个 caspase。

本试剂盒是基于 caspase-3 可以催化底物 Ac-DEVD-pNA 产生黄色的 pNA (*p*-nitroaniline),从而可以通过测定吸光度来检测 caspase-3 的活性。pNA 在 405nm 附近有强吸收。本试剂盒用酶标仪检测或容量不超过 100 μ L 的分光光度检测杯检测时,除标准曲线外可以检测 20 个样品(20T)或者 100 个样品(100T)。

产品组成:

编号	产品名称	规格	
		BL1212A	BL1212B
1	裂解液	8 mL	30 mL
2	检测缓冲液	8 mL	20 mL
3	Ac-DEVD-pNA(2mM)	200 μ L	1 mL
4	pNA(10mM)	200 μ L	1 mL

使用方法:

建议正式实验前,选取 2 个样本做预测定,了解实验样品情况,熟悉流程,避免样本和试剂浪费。

一、样本准备:

裂解液及检测缓冲液溶解后混匀,置于冰上备用。

1. 样本收集:

1.1. 对于悬浮细胞:把没有诱导凋亡的对照样品和诱导凋亡的样品,600g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟收集细胞,小心吸除上清,同时确保尽量没有细胞被吸除,PBS 洗涤一次。同前吸尽上清后,按照每 200 万细胞加入 100 微升裂解液的比例加入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 15 分钟。下转步骤 2;

1.2. 对于贴壁细胞:吸取细胞培养液,备用。用胰酶消化贴壁细胞,并收集至备用的细胞培养液中。600g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟收集细胞,小心吸除上清,同时确保尽量没有细胞被吸除,PBS 洗涤一次。同前吸尽上清后,按照每 200 万细胞加入 100 微升裂解液的比例加入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 15 分钟。下转步骤 2;

1.3. 对于组织样品:按照每 3-10mg 组织加入 100 微升裂解液的比例加入裂解液,在冰浴上用玻璃匀浆器匀浆。然后把匀浆液转移到 1.5mL 离心管中,冰浴再裂解 5 分钟。下转步骤 2;

2. 4 $^{\circ}$ C 16,000-20,000g 离心 10-15 分钟;

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意:在体外研究使用,不用于诊断或治疗用途,本产品不是医疗装置。



3. 把上清转移到冰浴预冷的离心管中；
4. 立即测定 caspase-3 的酶活性或-80°C 保存样品。同时可以取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度，尽量使蛋白浓度达到 1-3 mg/mL，相当于每 10 μ L 待测样品中至少含有 10-30 μ g 蛋白。如果细胞较少，可以适当增加细胞的用量。

二、caspase-3 酶的活性检测：

1. 取出适量的 Ac-DEVD-pNA (2mM)，置于冰浴上备用；
2. 如下设置反应体系：

试剂名称 (μ L)	测定管	标准管
检测缓冲液	40 μ L	40 μ L
待测样品	0 μ L	50 μ L
裂解液	50 μ L	0 μ L
Ac-DEVD-pNA(2mM)	10 μ L	10 μ L
总体积	100 μ L	100 μ L

注意：在设置反应体系时先加检测缓冲液，再加待测样品，适当混匀，注意避免在混匀时产生气泡。随后再加入 10 μ L Ac-DEVD-pNA(2mM)。

3. 加入 Ac-DEVD-pNA(2mM)后混匀，注意避免在混匀时产生气泡。37°C 孵育 60-120 分钟。发现颜色变化比较明显时即可测定 A405。如果颜色变化不明显，可以适当延长孵育时间，甚至可以孵育过夜。
4. 样品的 A405 扣除空白对照的 A405，即为样品中 caspase-3 催化产生的 pNA 产生的吸光度。通过同步步骤三中获得的标准曲线的对比就可以计算出样品中催化产生了多少量的 pNA。
5. 参考 Chemicon 公司的 caspase-3 酶活力单位的定义：One unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0nmol of the colorimetric substrate Ac-DEVD-pNA per hour at 37°C under saturated substrate concentrations。即一个酶活力单位定义为当底物饱和时，在 37°C 一个小时内可以剪切 1nmol Ac-DEVD-pNA 产生 1nmol pNA 的 caspase-3 的酶量。这样就可以计算出样品中含有多少个酶活力单位的 caspase-3。说明：在本试剂盒的检测体系中，底物的起始浓度为 0.2mM，此时底物是饱和的，对于许多样品而言在 37°C 孵育 2 个小时以内底物都是饱和的；对于样品中 caspase-3 酶活力特别高的情况，须用裂解液适当稀释样品后再进行测定。
6. 用 Bradford 法检测待测样品中的蛋白浓度（由于裂解液中含有较高浓度的 DTT，不适合采用 BCA 法进行蛋白浓度测定）。这样就可以计算出一个样品单位重量蛋白中所含的 caspase-3 的酶活力单位。

三、标准曲线制作：

1. 标准品稀释液的配制：按照每 0.9mL 检测缓冲液加入 0.1mL 裂解液的比例配制适量的标准品稀释液。
2. 把试剂盒提供的 pNA(10mM)用标准品稀释液稀释为 0、10、20、50、100 和 200 μ M，作为标准品。
3. 每个浓度取 100 μ L 用酶标仪进行检测，或取适当量用容量不超过 100 μ L 的分光光度检测杯进行检测，测定 A405。
4. 每一个标准品的 A405 减去不含 pNA 的空白对照的 A405 计算出实际的因 pNA 而导致的吸光度，并制作出 pNA 浓度相对于 A405 的标准曲线。pNA 标准曲线可以参考图 1，在 0-200 μ M 范围内存在良好的线性关系。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



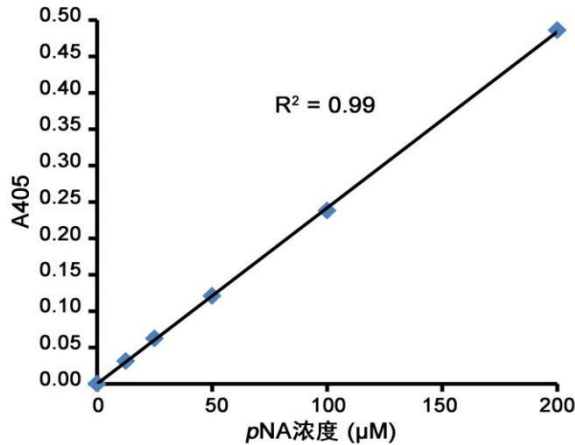


图 1. *p*NA 标准曲线示意图

常见问题:

1. 测定出的 A405 过低:

- 1.1. 样品中蛋白含量太低，裂解样品时需设法使样品中的蛋白浓度至少达到 1-3mg/L。
- 1.2. 样品中激活的 caspase 水平很低。首先确认凋亡现象是否明显，如果凋亡比较明显并且确认该 caspase 是可以被激活的，可以适当调节诱导细胞凋亡的时间，希望能找到一个 caspase 激活比较强的时间点，这样就可以检测出该 caspase 的激活。可以作一时间曲线，例如诱导凋亡 0、2、4、8、16 和 24 小时，或 0、1、2、4、8 和 16 小时，或 0、1、2、4、6 和 8 小时等。具体的诱导凋亡时间需根据具体情况而定。

2. 测定出的 A405 过高或者样品量不足:

测定出来的 A405 读数过高时，可以参考下表的反应体系适当减少样品的用量；样品量不足时也可以参考下表减少样品的用量。

试剂名称 (μL)	测定管	标准管
检测缓冲液	40 μL	40 μL
待测样品	0 μL	x μL
裂解液	50 μL	(50-x) μL
Ac-DEVD- <i>p</i> NA(2mM)	10 μL	10 μL
总体积	100 μL	100 μL

说明：其中 x 不超过 50，其余检测方法同上面的使用说明所述。

注意事项:

- 1、本产品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。
- 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

-20°C 保存，一年有效，Ac-DEVD-*p*NA 和 *p*NA 需要避光保存。

