



Caspase 3 活性检测试剂盒

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0010	裂解液	30mL
	检测缓冲液	20mL
	Ac-DEVD-pNA (2 mM)	1mL
	pNA(10mM)	1mL
	说明书	1 份

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。Caspase 3 可以剪切 procaspase 3、6、7 和 9, 并可以直接特异性剪切许多 caspase 底物, 包括 PARP(poly(ADP-ribose)polymerase), ICAD(Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease), 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。另外, caspase 3 在细胞核凋亡过程中也起到了关键作用, 包括染色质固缩(chromatin condensation), DNA 片段化(DNA fragmentation)等。同时 caspase 3 对细胞起泡(cell blebbing)也起到关键作用。

默科的 Caspase 3 活性检测试剂盒是基于 caspase 3 可以催化底物 Ac-DEVD-pNA(acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide)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。

试剂盒中提供了 caspase 3 催化产生的黄色产物 pNA, 可以作为定量 caspase 3 酶活性的标准品。

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。

保存条件

-20 $^{\circ}$ C 避光保存, 有效期 1 年。

注意事项

1. 须自备可以测定 A405 或 A400 的酶标仪或容量不超过 100 μ L 的分光光度检测杯及相应分光光度计。优先考虑测定 A405, 如有困难可以测定 A400。
2. Ac-YVAD-pNA 需尽量避免反复冻融, 请注意适当分装。
3. 测定蛋白浓度需 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒。建议样品用水稀释 1 倍后再用 Bradford 法测定蛋白浓度, 以降低 DTT 对蛋白浓度测定的干扰。
4. 有文献报道少数类型的细胞凋亡检测不到 caspase 3 的激活。
5. pNA(中文名为 4-硝基苯胺)对人体有毒, 操作时请特别小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。pNA(10mM)在 4 $^{\circ}$ C、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内, 可以 20-25 $^{\circ}$ C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
6. 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, 不得存放于普通住宅内。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

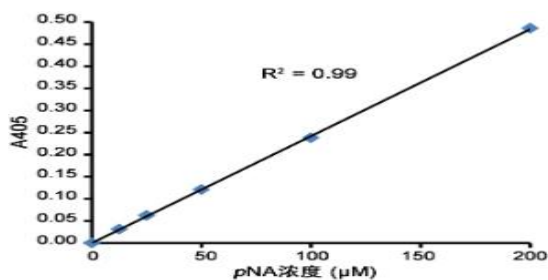
使用说明

1. 准备工作:

- (1) 裂解液溶解后混匀并置于冰浴上备用。
- (2) 检测缓冲液溶解后混匀并置于冰浴上备用。

2. 测定 pNA 标准曲线:

- (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 标准曲线可以参考下图, 在 0-200 μ M 范围内存在良好的线性关系。



pNA 标准曲线

注：实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

3. 样品的收集：

(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℃ 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 100μL 裂解液的比例加入裂解液（如果裂解不充分，可以把裂解液的用量提高至 150 或 200μL 升），重悬沉淀，冰浴裂解 15 分钟。下转步骤 3（4）。

(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℃ 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 100μL 裂解液的比例加入裂解液（如果裂解不充分，可以把裂解液的用量提高至 150 或 200μL），重悬沉淀，冰浴裂解 15 分钟。下转步骤 3（4）。

(3) **对于组织样品**：按照每 3-10mg 组织加入 100μL 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。

(4) 4℃ 16,000-20,000g 离心 10-15 分钟。

(5) 把上清转移到冰浴预冷的离心管中。

(6) 立即测定 caspase 3 的酶活性或 -70℃ 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 1-3mg/mL，相当于每 10μL 待测样品中至少含有 10-30 μg 蛋白。如果细胞较小，可以适当增加细胞的用量。

4. Caspase 3 酶活性的检测：

(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：

	空白对照	样品
检测缓冲液	40μL	40μL
待测样品	0μL	50μL
裂解液	50μL	0μL
Ac-DEVD-pNA(2mM)	10μL	10μL
总体积	100μL	100μL

注：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 10μL 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℃ 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 减去空白对照的 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 1 中获得的标准曲线的对比就可以计算出样品中催化产生多少量的 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℃ under saturated substrate concentrations。即一个酶活力单位定义为当底物饱和时，在 37℃ 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℃ 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。