



Caspase 3 活性检测试剂盒

Caspase 3 Activity Assay Kit

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-20T	包装规格-100T
MCK-0010	裂解液	8mL	30 mL
	检测缓冲液	8mL	10ml/瓶, 共 2 瓶
	Ac-DEVD-pNA (2 mM)	200μL	200 μl/管, 共 5 管
	pNA(10mM)	200μL	1mL
	说明书	1 份	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。

本 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 100μL 的分光光度检测杯检测时, 除标准曲线外, 20T 的包装可以检测 20 个样品, 100T 的包装可以检测 100 个样品。

保存条件

-20℃保存, 有效期一年。Ac-DEVD-pNA 和 pNA 需避光保存。

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 100μL 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, 可向默科订购。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℃、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℃水浴温育片刻至全部融解后使用。

6.本试剂盒的裂解液可以和默科生产的其它 caspase 活性检测试剂盒的裂解液通用, 即本试剂盒裂解液制备的蛋白样品可以用于默科其它 caspase 活性检测试剂盒的检测。

7.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。

8.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



(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。

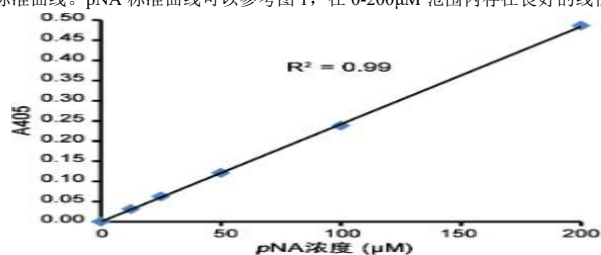


图 1: pNA 标准曲线。(实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。)

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 100 微升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 200 微升), 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 100 微升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 200 微升), 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 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。
- (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 10 微升待测样品中至少含有 10-30 μ g 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/ μ L	40	40
待测样品/ μ L	0	50
裂解液/ μ L	50	0
Ac-DEVD-pNA (2mM)/ μ L	10	10
总体积/ μ L	100	100

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℃ 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℃ undersaturated 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- 产生 pNA 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检测。

(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。