

Caspase-3 活性检测试剂盒（比色法）

货号：PMK1903

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：20T/50T/100T

适用样本：动物组织、细胞

产品简介

Caspase 全称为含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyI aspartate specific proteinase)。Caspase 是一类蛋白酶家族，成员较多，该家族已显示在凋亡中起关键作用。哺乳动物 caspases 可分为三个功能组：启动子半胱天冬酶（Caspase-2、8、9 和 10），执行者半胱天冬酶（Caspase-3、6 和 7）和炎性半胱天冬酶（Caspase-3、4、5、11 和 12）。Caspase-3（也称为 Yama, CPP32 和 Apopain）在天冬氨酸残基的羧基末端切割其底物。活性 Caspase-3 由两组同源二聚体（17 和 12 kDa）组成，它们均来自两个前体 Caspase-3 多肽，并具有两个活性位点。Caspase-3 与 Caspases-8 和 9 一起位于细胞凋亡途径的关键连接点。本试剂盒基于 Caspase-3 水解肽底物 Ac-DEVD-pNA（acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-对硝基苯胺），产生黄色的对硝基苯胺（pNA），pNA 在 405nm 附近有强吸收，从而可以通过测定吸光度来检测 Caspase-3 的活性。

产品内容

试剂盒组分	规格			储存条件
	20T	50T	100T	
细胞裂解液	20mL	50mL	100mL	4℃
反应缓冲液（2×）	5mL	10mL	20mL	4℃
底物	140 μL	350 μL	700 μL	-20℃，避光保存
pNA 标准品(10mM)	100 μL	250 μL	500 μL	-20℃，避光保存
DTT	300 μL	750 μL	1.5mL	-20℃

自备耗材

酶标仪（能测 405nm 处的吸光度）
低温离心机、制冰机
96 孔板、可调节式移液枪及枪头
去离子水、磷酸盐缓冲液（PBS）
匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

细胞裂解液：使用前按 1mL 细胞裂解液加入 10 μL DTT 的比例加入 DTT，置于冰上备用。

1×反应缓冲液（含 DTT）：使用前将反应缓冲液（2×）加等体积去离子水稀释到反应缓冲液（1×），再按 1mL 反应缓冲液（1×）加入 10μL DTT 的比例加入 DTT，置于冰上备用。

底物：即用型；实验过程中置于冰上；-20℃保存。用不完的试剂-20℃避光分装保存，避免反复冻融。

DTT：即用型；实验过程中置于冰上；-20℃保存。用不完的试剂-20℃分装保存，避免反复冻融。

标准曲线设置：取 20μL pNA 标准品（10mM）用 180μL 1×反应缓冲液（含 DTT）稀释至 1000μM pNA 标准品。用 1000μM pNA 按下表所示，进行下一步稀释：

	标准品体积	1×反应缓冲液（含 DTT）体积（μL）	浓度（μM）
Std. 1	200μL of 1000μM pNA	0	1000

产品说明书

Std. 2	100μL of Std. 1 (1000μM)	100	500
Std. 3	100μL of Std. 2 (500μM)	100	250
Std. 4	100μL of Std. 3 (250μM)	100	125
Std. 5	100μL of Std. 4 (125μM)	100	62.5
Std. 6	100μL of Std. 5 (62.5μM)	100	31.25
Std. 7	100μL of Std. 6 (31.25μM)	100	15.6

注意：每次实验，请使用新配制标准品。用不完的标准品-20℃避光分装保存，避免反复冻融

样本制备

1. 通过所需方法诱导细胞凋亡。同时，建议对每个样本设置不诱导的对照培养。
对于贴壁细胞，胰蛋白酶消化收集细胞。600g，4℃离心 5min，小心吸去上清液。用 1mL PBS 洗涤细胞 2 次。离心后，去除上清液。在 1mL 细胞裂解液中重悬 5×10^6 个细胞。
对于悬浮细胞，600g，4℃离心 5min，小心吸去上清液。用 1mL PBS 洗涤细胞 2 次。离心后，去除上清液。在 1mL 细胞裂解液中重悬 5×10^6 个细胞。
对于组织，将 0.1g 组织切成小块，用 PBS 清洗组织，加入 1mL 细胞裂解液，冰浴匀浆。

2. 裂解物冰上孵育 15-20min。
 3. 16,000g，4℃离心 15min，然后将上清液转移至新 EP 管中，置冰上待测。
 4. 立即测定 Caspase-3 的酶活性或-80℃保存样品。同时可以取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度。
- 注意：1. 推荐使用新鲜样品。如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存一个月，使用前，在冰上解冻。**
2. 在样品制备步骤中请勿使用蛋白酶抑制剂，可能会干扰测定。
3. 如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 405nm。
2. 操作表（下述操作在 96 孔板中操作）：

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)
1×反应缓冲液 (含 DTT)	100	50	50
不同浓度标准品	0	50	0
样本上清	0	0	50
底物	5	5	5

3. 混匀，37℃孵育 1-2h，检测 405nm 处吸光值。空白孔记为 $A_{空}$ ，标准孔记为 $A_{标}$ 、测定孔记为 $A_{测}$ 。计算 $\Delta A_{测} = A_{测} - A_{空}$ ， $\Delta A_{标} = A_{标} - A_{空}$ 。

注意：1. 空白孔只需测定 1 次。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验；如果 $\Delta A_{测}$ 小于 0.001 可适当加大样本量，如果 $\Delta A_{测}$ 大于 1.0，用细胞裂解液适当稀释样品后再进行测定，计算结果乘以稀释倍数。
2. 在反应体系中，适当混匀，注意避免在混匀时产生气泡；3. 发现颜色变化比较明显时即可测定 405nm 的波长。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。

结果计算

1. 标准曲线的绘制：
以 $\Delta A_{标}$ 为 x 轴，标准溶液浓度为 y 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将样本的 $\Delta A_{测}$ 带入方程得到 y 值 (μM 即 nmol/mL)。
2. Caspase-3 活性的计算
(1) 按蛋白浓度计算

产品说明书

活性单位定义：为当底物饱和时，37℃环境下，每毫克蛋白在反应体系中每小时剪切 1nmol pNA 底物产生 1nmol 游离 pNA 的酶量定义为 1 个酶活力单位。

Caspase-3 活性 (U/mg prot) = $y \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2.1 \times y \div \text{Cpr} \div T$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：为当底物饱和时，37℃环境下，每克样本在反应体系中每小时剪切 1nmol pNA 底物产生 1nmol 游离 pNA 的酶量定义为 1 个酶活力单位。

Caspase-3 活性 (U/g 鲜重) = $y \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.1 \times y \div W \div T$

(3) 按细胞数量计算

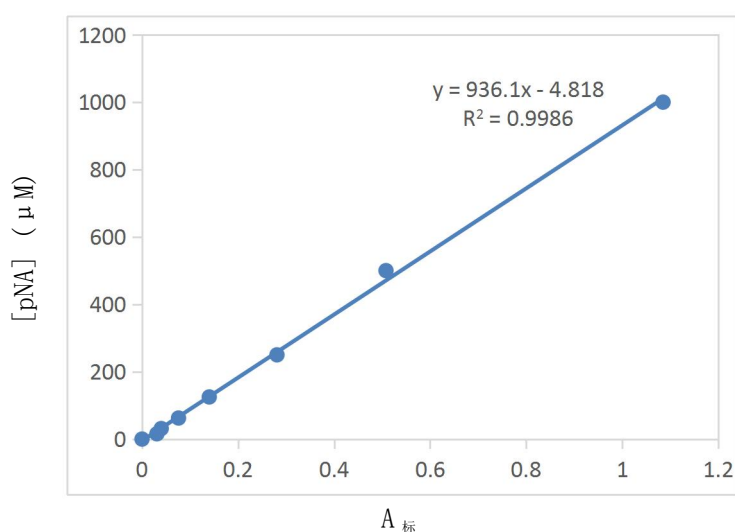
活性单位定义：为当底物饱和时，37℃环境下，每 10⁴ 个细胞在反应体系中每小时剪切 1nmol pNA 底物产生 1nmol 游离 pNA 的酶量定义为 1 个酶活力单位。

Caspase-3 活性 (U/10⁴ cell) = $y \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.1 \times y \div \text{细胞数量} \div T$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.105mL； $V_{\text{样}}$ ：加入的样本体积，0.05mL；T：反应时间，h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品鲜重，g； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液的体积，1mL；细胞数量：以万为单位的细胞数量。

结果展示

典型标准曲线—以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



相关产品：

PMK0872 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(增强型)

PMK0988 Annexin V-fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒

PMK0989 Calcein-AM/PI 活/死细胞双染色试剂盒

PMK0992 EdU-488 法细胞增殖成像检测试剂盒

PMK0993 EdU-555 法细胞增殖成像检测试剂盒

PMK0997 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)

PMK0998 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)

更多产品详情了解，请关注公众号：

