

Caspase-3 活性检测试剂盒

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0713	Caspase-3 活性检测试剂盒	100T

产品内容

名称	规格	储存条件
裂解缓冲液	20mL	-20℃, 避光; 避免反复冻融。
检测缓冲液	10mL	
Ac-DEVD-pNA (2mM)	1mL	
pNA (10mM)	1mL	

一、产品说明

胱氨酸依赖性天冬氨酸定向蛋白酶 (Caspases) 是半胱氨酸蛋白酶家族的一员, 在细胞凋亡、坏死和炎症中发挥着重要作用。Caspase 的顺序激活在细胞凋亡中发挥着重要作用。Caspase 3, 又称 CPP32、Yama 或 apopain, 属于 Caspase 家族的 CED-3 亚家族。Caspase 3 可以剪切 procaspase 2、6、7、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。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。Caspase 3 也可对细胞起泡 (Cell blebbing) 起到关键作用。

翼飞雪 Caspase 3 活性检测试剂盒基于分光光度法检测 Caspase 3 的活性, Caspase 3 可以催化底物 Ac-DEVD-pNA 并产生黄色的游离 pNA, 使用分光光度计在 405 nm 对 pNA 的发光进行定量, 进而确定 Caspase 3 的活性。

二、样品准备

- 1、组织: 按照 3-10mg 组织: 50-100 μ L 裂解缓冲液的比例, 加入裂解缓冲液, 冰上充分匀浆后, 将匀浆液冰上冰浴 5min。
- 2、悬浮细胞: 4℃ 600g 离心 5min 收集细胞, 弃上清, 加入 PBS 洗涤细胞。按照 2 \times 10⁶ 细胞: 50-100 μ L 裂解缓冲液的比例, 充分悬浮细胞, 冰上冰浴 30min。
- 3、贴壁细胞: 小心吸取培养液保存备用。加入适量胰蛋白酶消化细胞, 再加入前面收集的 培养液, 轻轻混匀。4℃ 600g 离心 5min 收集细胞, 弃上清, 加入 PBS 洗涤细胞。按照 2 \times 10⁶ 细胞: 50-100 μ L 裂解缓冲液的比例, 充分悬浮细胞, 冰上冰浴 30min。
- 4、4℃ 16000-20000g 离心 10-15min, 取上清至预冷的离心管中。

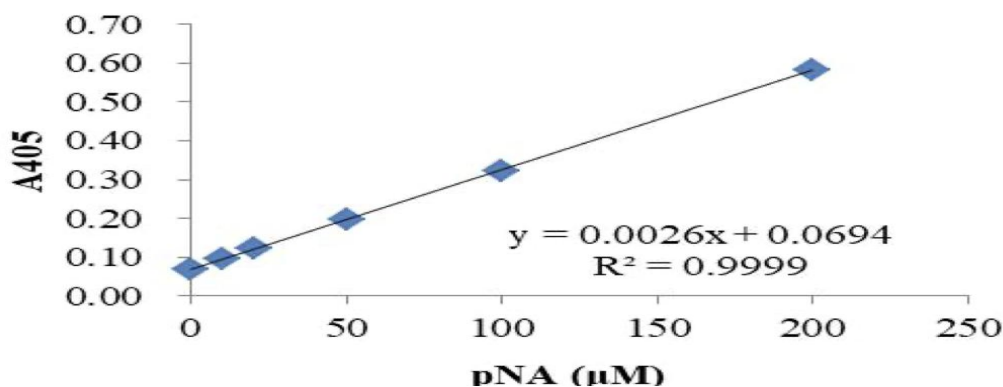
注: 1) 收集的上清可立即进行酶活检测, 或于 -80℃ 储存。

2) 取少量上清通过 Bradford 法测定蛋白浓度, 蛋白浓度在 5mg/mL 左右最佳。

三、活性测定

为获取更可靠的检测结果, 建议每个样品设置 2-3 个平行孔。

1、pNA 标准曲线的制备: 按照每 0.9mL 检测缓冲液渐入 0.1mL 裂解缓冲液的比例配制适量的标准品稀释液, 用标准品稀释液将 pNA (10mM) 稀释至 0、10、20、50、100、200 μ M 作为标准品。每个浓度各取 100 μ L 用酶标仪或分光光度计测定 A405, 依据标准品浓度 (x, μ M) 和吸光度 (y, 减去浓度为 0 的空白管的 A405) 制作标准曲线。pNA 标准曲线可参考下图, 在 0-200 μ M 范围内存在良好的线性关系。



2、操作表: 按照下表依次加入试剂。

试剂名称 (μ L)	样本孔	空白孔
检测缓冲液	80	80
样本	10	0
裂解缓冲液	0	10
Ac-DEVD-pNA (2mM)	10	10

3、37 $^{\circ}$ C 孵育 1-2h, 颜色变化比较明显时测定 A405。

4、计算 A405 样品 - A405 空白的值, 即为样品中 Caspase-3 催化产生的 pNA 的吸光度, 根据标准曲线计算出对应的 pNA 的量。

注: 一个酶活单位可定义为当底物饱和时, 在 37 $^{\circ}$ C 1h 内剪切 1nmol Ac-DEVD-pNA 产生 1nmol pNA 的 Caspase-3 的量。

5、用 Bradford 法测定待测样品的蛋白浓度 (若裂解液中含有较高浓度的 DTT, 则不适合采用 BCA 法), 即可计算出样品中单位重量蛋白中所含 Caspase-3 的酶活单位。

四、注意事项

1、在本试剂盒的检测体系中, 底物起始浓度为 0.2 mM。对于大多数样品, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 以内底物都是饱和的。对于样品中 Caspase 1 酶活力特别高的情况, 必须用裂解液稀释后再进行测定。

2、Ac-DEVD-pNA 可适当分装, 避免反复冻融。

3、pNA 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。

4、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, 20-25 $^{\circ}$ C 水浴全部融解即可使用。

5、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。