Caspase-3 活性测定试剂盒

Caspase-3 colorimetric assay Kit

货号：BC3830

保存：试剂常温运输，到达后按要求储存，1 年内稳定。

产品内容： （所示为 100T，50T 检测试剂量减半）

1. 裂解缓冲液	20 ml, 4 ºC
2. 反应缓冲液	10 ml, 4 ºC
3. 2 mM DEVD-*p*NA 底物	0. 5 ml, -20 ºC 避光
4. 10 mM *p*NA 标准品	0.2ml, -20 ºC 避光

产品介绍：

Caspase-3 是凋亡过程中最主要的终末蛋白酶，也是研究最多的 caspase；它激活 pro-caspase-2,6,7,9，特异水解多种关键凋亡蛋白如 PARP，介导染色质固缩、凋亡小体生成、核 DNA 断裂。测定原理基于 Caspase-3 特异水解多肽底物 DEVD-*p*NA (Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilide)，释放的游离硝基苯胺 *p*NA 在 405 nm 有最大吸光度。采用可见光光度比色法测定 *p*NA 而得到 Caspase 活性。适用于检测哺乳动物组织、细胞 Caspase-3 活性。

所需仪器：

可见光分光光度计配 100μl 比色杯，或酶标仪。最佳波长 405 nm，也可测 OD400~450 nm 但灵敏度略降。

操作步骤：

一、组织细胞准备：

Caspase活性测定值低，最常见原因是未发生凋亡或细胞量太少，其次是观测时间点不恰当。诱导凋亡时，并非剂量越大时间越长Caspase活性就越高。可设置不同剂量和时间点如0、2、4、8、16、24小时，以检测最佳的观察点。通常2×10^7细胞或2mg组织裂解于1ml可产生1~3mg/ml蛋白。初次测定时，单个测定反应可加~200μg蛋白物对应于2×10^6细胞或2个孔的6孔板细胞。最少，单个测定反应需加20μg蛋白对应于2×10^5个细胞或2个孔的12孔板细胞。勿用丝氨酸蛋白酶抑制剂如E-64和leupeptin以免抑制Caspase活性。

1、（1）细胞裂解：1000g 5分钟收集细胞，吸尽上清。每2~10×10^6细胞加50~100μl裂解液震荡裂解，冰浴10分钟，再次震荡。

(2) 组织裂解：3~10mg组织加100 μl裂解液放入小型玻璃匀浆器，上下匀浆30次。转移匀浆液于离心管。

2、4 ºC 12,000g 10分钟，取上清测定，或-70 ºC保存。

3、蛋白定量：用Bradford法测定蛋白浓度。裂解液含还原剂不宜采用BCA法。应使蛋白浓度达到1-3 mg/ml，相当于每10 μl待测样品含10-30μg蛋白，否则应增加细胞用量。

二、测定*p*NA标准曲线：

1.用反应缓冲液稀释 10mM *p*NA 标准品为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125μM。设置不加 *p*NA 的零管。

2.每一浓度取 100 μl 加入 96 孔板或 100μl 比色杯，测定 405nm 吸光度 OD 值。

3.每一浓度标准管 OD405 值为 *x* 轴，对应的 *p*NA 浓度为 *y* 轴，用 *Excel* 制作 *p*NA 浓度对 OD405 值的标准曲线。

三、样品测定操作：

1.按下表设置 96 孔板反应体系。底物最后加入以使各管反应起始时间相同。设置不加样品的空白对照管。酶活力不足或过高，可增加或减少样品。

2.盖紧96孔板盖子并用封口膜密封。37 ºC反应2小时，肉眼可见颜色变黄时的OD405值约为0.2，此时即可测定。颜色变化不明显可延长反应或过夜，但酶活性较强时，孵育时间过长将导致反应失去线性关系。

3.样品管OD405减去空白对照OD405，为样品Caspase水解底物产生的*p*NA吸光度。根据标准曲线计算其含量，并以蛋白浓度校正之。

4.测得的Caspase酶活性表示方法有两种。

(1) Caspase活性增加的百分比：100% × 实验处理组OD / 实验对照组OD，简单而可靠。

(2) 样品Caspase酶活力单位/mg protein，精确但计算较复杂，参见说明。

反应体系参考表 *(允许适当调整样品加样量)*

	无样品 空白对照	高酶活性 样品	低酶活性 样品
反应缓冲液μl	95	85	60
待测样品μl	—	10	35
底物 μl	5	5	5
总体积μl	100	100	100

产品说明：

1.Caspase酶活力单位定义：参考Chemicon公司One unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0 nmol of the colorimetric *p*NA-substrate per hour at 37 ºC under saturated substrate concentrations。即当底物饱和时,一个Caspase酶活力单位定义为37 ºC 1小时水解*p*NA底物，产生1nmol游离*p*NA。根据*p*NA标准曲线和样品OD值，可计算出Caspase酶活力单位。

2. 除了处理组外，可设置阳性凋亡诱导剂组，阴性实验对照可包括不具有凋亡诱导作用的试剂(如果能得到)处理组、溶剂对照组、或凋亡诱导零时间点。

参考文献：

1. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J. **326**, 1-16 (1997).

2. Porter AG and Janicke RU. Emerging role of caspase-3 in apoptosis. Cell Death Differ. **6**, 99-104 (1999).