

# Caspase 3分光光度法检测试剂盒

20T WLA047a 50T WLA047b



仅用于科学研究,不能用于诊断

## 产品信息

### 产品名称

Caspase 3分光光度法检测试剂盒

### 产品概述

Caspase家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用。其中Caspase 3是哺乳动物细胞中研究最多的一个蛋白,它与DNA断裂、染色质凝聚和凋亡小体形成有关。Caspase 3在正常状态下以酶原的形式存在于胞浆中,没有活性;但在细胞发生凋亡阶段,它被激活,活化的Caspase 3由两个大亚基和两个小亚基组成,裂解相应的胞浆核底物,最终导致细胞凋亡。

本试剂盒是基于Caspase 3可以催化底物Ac-DEVD-pNA (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroaniline) 产生黄色的NA (p-nitroaniline),从而可以通过测定吸光度来检测Caspase 3的活性。NA在405nm附近有强吸收峰。

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。

### 包装信息

试剂名称	WLA047a (20T)	WLA047b (50T)	保存条件	有效期
裂解液	5ml	13ml	-20°C	6个月
检测缓冲液	8ml	20ml	-20°C	6个月
Ac-DEVD-pNA (2mM)	200µl	500µl	-20°C避光	6个月
pNA (10mM)	200µl	500µl	-20°C避光	6个月

### 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-DEVD-pNA需尽量避免反复冻融,请注意适当分装。
3. 测定蛋白浓度需用Bradford蛋白浓度测定试剂盒(WLA012)可向本公司订购。建议样品用水适当稀释后再用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)有毒,请注意小心防护。pNA(10mM)在4°C、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管底、管壁或管盖内,可以20-25°C水浴温育片刻至全部溶解后使用。
6. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 操作流程

#### 一、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。

#### 二、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200µM,作为标准品。
3. 每个浓度取100µl用酶标仪进行检测,或取适当量用容量不超过100µl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浓度相当于A405的标准曲线。

#### 三、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,1000rpm 4°C离心5min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,重悬沉淀,冰浴裂解15min。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。1000rpm 4°C离心5min收集细胞,小心吸除上清,同时确保尽量没有细胞被吸除,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,重悬沉淀,冰浴裂解15min。下转步骤3-4。
3. 对于组织样品:按照每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5min。
4. 4°C 12000rpm离心15min。
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°C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待测样品中含有10-30µg蛋白。如果细胞较小,可以适当增加细胞的用量。

# Caspase 3分光光度法检测试剂盒

20T WLA047a 50T WLA047b

仅用于科学研究,不能用于诊断



## 产品信息

### 四、Caspase 3酶活性的检测:

1. 取出pNA和适量的Ac-DEVD-pNA (2mM) , 置于冰浴上备用。
2. 如下设置反应体系:

试剂名称	空白对照	样品
检测缓冲液	90 $\mu$ l	80 $\mu$ l
待测样品	0 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Ac-DEVD-pNA (2mM)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
总体积	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

注: ①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 $\mu$ l Ac-DEVD-pNA (2mM) 。

②在测定组织样本时, 可以加大样本量, 一般为2-4倍。

3. 加入Ac-DEVD-pNA (2mM) 后混匀, 注意避免在混匀时产生气泡。37 $^{\circ}$ C 孵育2-4h。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。通过同步骤二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。