



Caspase-3 活性测试盒说明书（简化版）

（货号：G015-1 适用于酶标仪或分光光度计测定）

一、产品简介

本试剂盒采用分光光度计或酶标仪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。

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 caspase3，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 2、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。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，裂解相应的胞浆胞核底物，最终导致细胞凋亡。

Caspase-3 检测试剂盒就是将 caspase-3 序列特异性的多肽（Ac-DEVD-pNA (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide) 偶联至黄色基团：pNA (p-nitroaniline)；当该底物被 Caspase-3 剪切后，黄色基团 pNA 即游离出来，可通过酶标仪或分光光度计（ $\lambda=405\text{nm}$ 或 400nm ）测定其吸光值，考察 caspase-3 的活化程度。pNA 在 405nm 附近有强吸收。

本试剂盒适用于培养细胞及新鲜组织 caspase-3 活性的检测。

二、试剂盒组份

组份	试剂规格			储存条件
	G015-1-1 20T	G015-1-2 50T	G015-1-3 100T	
裂解液	5.0ml	10.0ml	15.0ml	4℃保存
2×反应液	1.0ml	2.5ml	5.0ml	4℃保存
Ac-DEVD-pNA	100μl	250μl	500μl	-20℃，避光保存
DTT	50μl	100μl	150μl	-20℃保存

三、自备仪器和试剂

低温高速离心机、酶标仪或分光光度计（100μl的比色皿）、微量移液器、玻璃匀浆器（组织样本）1.5m L离心管、PBS、蛋白定量试剂及仪器。



四、保存条件：-20℃保存，Ac-DEVD-pNA需避光保存。

五、操作步骤：

1、准备工作：

- a、裂解液溶解后混匀并置于冰浴上备用。
- b、裂解液工作液的准备：使用前每50μl 裂解液加入0.5μl DTT
- c、2×反应液溶解后混匀并置于冰浴上备用

2、样品的处理：

a、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，离心（2000rpm，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50微升裂解液的比例加入裂解液，重悬沉淀，冰浴裂解30min，其间涡旋振荡3~4次，每次10s；或冻融2~3次。下转第3步进行实验。

b、对于贴壁细胞：

按常规的方法用胰酶消化贴壁细胞，并收集细胞。用PBS洗涤一次，吸尽上清后，按照每200万细胞加入50微升裂解液的比例加入裂解液，重悬沉淀，冰浴裂解30min，其间涡旋振荡3~4次，每次10 s；或冻融2~3次。下转第3步进行实验。

c、对于组织样品

每50mg固体组织置于培养皿中，手术剪剪碎成3mm×3mm左右的小块，加入50μl 冰冷裂解液工作液，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。下转第3步进行实验。

3、4℃离心（12000rpm， 10~15min）。

4、小心吸取上清（含裂解的蛋白质）转移至新的管中，并放置冰上待用。

5、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。如果细胞较小，可以适当增加细胞的用量。

6、Caspase 3酶活性的检测：

- a、取出适量的Ac-DEVD-pNA 和2×反应液，置于冰浴上备用。
- b、使用前每50μl 2×反应液加入0.5μl DTT。



c、吸取50 μ l含100~200 μ g蛋白的细胞或组织裂解液上清；如体积不足50 μ l用裂解液补足至总体积50 μ l（各组均采用同样的蛋白量进行测定和比较）。

d、如下设置反应体系：

	空白对照	样品
2 \times 反应液	50 μ l	50 μ l
裂解液	50 μ l	0 μ l
待测样品	0 μ l	50 μ l
Ac-DEVD-pNA	5 μ l	5 μ l
总体积	105 μ l	105 μ l

e、加入Ac-DEVD-pNA 后混匀，注意避免在混匀时产生气泡。37 $^{\circ}$ C 孵育4hr。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。

f、用酶标仪或分光光度计（100 μ l的比色皿）在 λ =405nm或400nm测定其吸光值。

g、通过计算OD_{诱导剂}/OD_{阴性对照}的倍数来确定凋亡诱导剂组Caspase-3活化程度。

7、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 1.0 nmol of the colorimetric substrate Ac-DEVD-pNA per hour at 37 $^{\circ}$ C under saturated substrate concentrations。即一个酶活力单位定义为当底物饱和时，在37 $^{\circ}$ C可以剪切1nmol Ac-DEVD-pNA产生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 $^{\circ}$ C 孵育4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测定。