Caspase-3 活性分析试剂盒（比色法）

货号: KTA3022　　规格：20 T/50 T/100 T　　批号：见产品标签

	适用样本：细胞、动物组织
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

Caspases (Cysteine-requiring Aspartate Proteases)是一类蛋白酶家族，在细胞凋亡、坏死和炎症中发挥着重要作用。根据功能不同，哺乳动物 Caspases 可分为三类：起始 Caspases (包括 Caspase-2、8、9 和 10)，负责启动凋亡级联反应；执行 Caspases (包括 Caspase-3、6 和 7)，负责直接切割细胞内的多种靶蛋白，导致细胞凋亡的特征性变化，如 DNA 片段化、细胞膜起泡等；炎性 Caspases (Caspase-1、4、5、11 和 12)，主要参与炎症反应，通过激活细胞因子（如 IL-1β和 IL-18）来调节免疫反应。Caspase-3 也称为 Yama，CPP32 和 Apopain，是细胞凋亡中关键效应蛋白酶，负责执行细胞凋亡的最后阶段，在介导细胞凋亡（包括染色质凝聚和 DNA 片段化）中起核心作用。另外，Caspase-3 也可以剪切激活 Gasdermin E (GSDME)，引发细胞焦亡。

Caspase-3 活性分析试剂盒（比色法）为检测 Caspase-3 活性提供了一种简便而快捷的方法。本试剂盒基于 Ac-DEVD-pNA 底物，可同时识别活化型 Caspase-3 与 Caspase-7 的总酶活性。底物在 Caspase-3 作用下释放出黄色的 pNA（对硝基苯胺），pNA 在 405 nm 处具有最大吸收峰，通过测量 405 nm 处吸光度值，使用 pNA 标准品绘制的标准曲线计算 Caspase-3 活性结果。

02 包装清单

试剂盒组分	规格			储存要求
	20 T	50 T	100 T	
Extraction Buffer	20 mL	50 mL	100 mL	-20℃保存
Assay Buffer	20 mL	50 mL	100 mL	-20℃保存
Ac-DEVD-pNA (4 mM)	100 μL	250 μL	500 μL	-20℃，避光保存
pNA (10 mM)	100 μL	250 μL	500 μL	-20℃保存

***本试剂盒在酶标仪检测条件下（制作标准曲线消耗 Assay Buffer 与 pNA (10 mM)，不影响该样品检测通量）：20 T 可检测 20 份样品，50 T 可检测 50 份样品，100 T 可检测 100 份样品。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪、低温离心机、制冰机	酶标仪需能检测 405 nm 处的吸光度
耗材	细胞培养孔板、96 孔板及封板膜	普通 12 孔细胞培养板、普通透明板
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）、去离子水	配液、清洗
其他	可调节式移液枪及枪头、匀浆器	组织样本需用到匀浆器

04 注意事项

- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存
Assay Buffer	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存
Ac-DEVD-pNA (4 mM)	即用型；使用前平衡到室温	-20℃，避光保存
pNA (10 mM)	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存

05-1-2 标准品配制

用 Assay Buffer 将标准品 pNA (10 mM) 稀释为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、0 μM 的标准溶液。

序号	标准品体积	Assay Buffer (μL)	标准品浓度（μM）
Std.1	6 μL pNA (10 mM)	294	200
Std.2	150 μL of Std.1 (200 μM)	150	100
Std.3	150 μL of Std.2 (100 μM)	150	50
Std.4	150 μL of Std.3 (50 μM)	150	25
Std.5	150 μL of Std.4 (25 μM)	150	12.5
Std.6	150 μL of Std.5 (12.5 μM)	150	6.25
Std.7	150 μL of Std.6 (6.25 μM)	150	3.125
Std.8	0	150	0

05-2 样本制备

注意：我们建议使用新鲜样品。保存在-80℃的样品使用前请在冰上解冻，冻融过程可能会影响样品的稳定性，并且读数可能会低于预期。此试剂盒可检测蛋白水解活性。在样品制备步骤中请勿使用蛋白酶抑制剂，它可能会干扰测定。

细胞凋亡阳性诱导：选择合适的方法诱导细胞凋亡，同时，建议对每个 Caspase-3 比色测定设置不诱导的对照培养。

- **对于贴壁细胞**：胰蛋白酶消化后收集细胞。600 g，4℃离心 5 min，小心吸去上清液。用 1 mL PBS 洗涤细胞 2 次。离心后，去除上清液。在 0.5 mL Extraction Buffer 中重悬 5×10^6 个细胞。冰上孵育 20 min，12000 g，4℃离心 10 min，取上清液置冰上待测。同时可以取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度，推荐使用亚科因货号：KTD3002 的蛋白质定量试剂盒（Bradford 法）。
- **对于悬浮细胞**：600 g，4℃离心 5 min，小心吸去上清液。用 1 mL PBS 洗涤细胞 2 次。离心后，去除上清液。在 0.5 mL Extraction Buffer 中重悬 5×10^6 个细胞。冰上孵育 20 min，12000 g，4℃离心 10 min，取上清液置冰上待测。同时可以取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度，推荐使用亚科因货号：KTD3002 的蛋白质定量试剂盒（Bradford 法）。
- **对于组织**：取 50 mg 组织，用 PBS 清洗，加入 0.5 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆（推荐参数：加入 3 颗 3 mm 研磨珠，55 Hz，匀浆 30 s，间隔 10 s，重复 6 次），然后 12000 g，4℃离心 10 min，取上清液置冰上待测。同时可以取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度，推荐使用亚科因货号：KTD3002 的蛋白质定量试剂盒（Bradford 法）。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 405 nm。

2. 操作表（下述操作在 96 孔板中操作）：

试剂名称	测定孔（μL）	对照孔（μL）	空白孔（μL）	标准孔（μL）
Assay Buffer	45	50	100	0
Standard	0	0	0	100
上清	50	50	0	0
Ac-DEVD-pNA (4 mM)	5	0	0	0
混匀，37℃孵育 1-2 h，检测 405 nm 处吸光值。计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$。			**立即检测 405 nm 处吸光值，计算$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。**	

注意：

1) 空白孔和标准孔只需测定 1-2 次，每个样本均需操作测定孔与对照孔。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验；

2) 加入 5 μL Ac-DEVD-pNA 时建议在液面下加入并混匀，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 405 nm 的吸光度。如果颜色变化不明显，可以适当延长孵育时间。孵育过程中注意密封（如使用封板膜或带盖板的 96 孔板），避免反应体系体积挥发，影响结果准确性。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn]进入“**技术中心**”查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 按标准曲线计算

以标准溶液浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线 y=kx+b。将样本的$\Delta A_{测定}$带入方程得到 y 值（μM）。

2. Caspase-3 酶活性计算

- 按样本质量计算

酶活单位定义：在 37℃下，每 g 样品每小时催化产生 1 nmol pNA 的酶量定义为 1 个酶活单位。

Caspase-3 活性（U/g）$=y\times V_{反总}\div(V_{样}\times W\div V_{样总})\div T\times 10^3$**$=y\div W\div T$**

- 按细胞数量计算:

酶活单位定义：在 37℃下，每 10^6 个细胞每小时催化产生 1 nmol pNA 的酶量定义为 1 个酶活单位。

Caspase-3 活性（U/10^6）$=y\times V_{反总}\div(V_{样}\times N\div V_{样总})\div T\times 10^3$**$=y\div N\div T$**

- 按蛋白浓度计算

酶活单位定义：在 37℃下，每 mg 蛋白每小时催化产生 1 nmol pNA 的酶量定义为 1 个酶活单位。

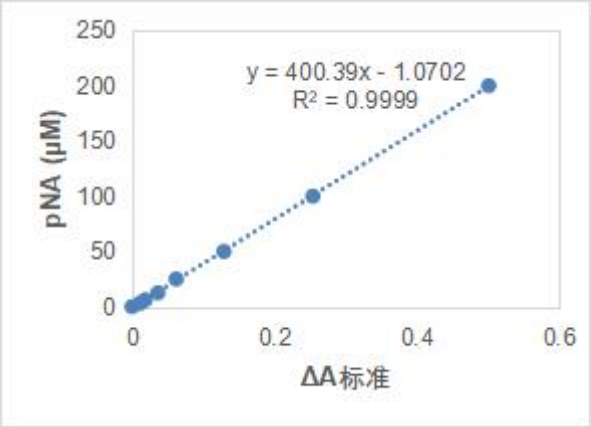
Caspase-3 活性（U/mg prot）$=y\times V_{反总}\div(V_{样}\times Cpr)\div T\times 10^3$**$=2\times y\div Cpr\div T$**

$V_{反总}$：反应体系总体积，0.1 mL=1×10^{-4} L；$V_{样}$：加入的样本体积，0.05 mL；$V_{样总}$：样品加入的提取液体积，0.5 mL；W：样品质量，g；T：反应时间，h；N：细胞数量，以 10^6 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=5）；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；10^3：单位换算系数，1 μmol =10^3 nmol。

注意：对于样品测得$\Delta A_{测定}$>0.5 时，须用 Extraction Buffer 适当稀释样品后再进行测定，计算时再乘以稀释倍数 n。

07 结果示例

典型标准曲线：y=400.39x-1.0702，R^2=0.9999。



示例：收集 5×10^6 个 10 μM 喜树碱处理 5 小时的 Jurkat 细胞，加入 500 μL Extraction Buffer，按照测定步骤操作，37℃孵育 1 h 后用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.307-0.089=0.218$，将$\Delta A_{测定}$代入标准曲线方程，得到 y=86.21 μM，Caspase-3 活性（$U/10^6$）=y÷N÷T=86.21÷5÷1=17.24 $U/10^6$。

08 FAQ

1．请问细胞有红色或绿色荧光会有影响吗？

理论上没有影响的。

2．Caspase 试剂盒里面标准品 pNA 必须做吗？

样本的酶活需要根据生成的 pNA 的量来确定的，而样本中 pNA 的生成量需要根据标曲方程计算获得，因此必须要绘制标准曲线。

3．测定出的 A405 过高或者样品量不足

在反应体系中可适当减少样品的用量，用 Extraction Buffer 补足至总体积 50 μL 再检测。

4．测定出的 A405 过低

1）样品中蛋白含量太低，裂解样品时需设法使样品中的蛋白浓度至少达到 1-3 mg/mL。

2）样品中激活的 Caspase 水平很低。首先确认凋亡现象是否明显，如果凋亡比较明显并且确认该 Caspase 是可以被激活的，可以适当调节诱导细胞凋亡的时间，找到 Caspase 激活比较强的时间点，这样就可以检测出该 Caspase 的激活。可以作酶活一时间曲线，具体诱导凋亡时间需根据具体情况而定。

5．孵育时间延长至 4 h 颜色依然不明显可以继续延长吗？

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。

6．该试剂盒的细胞裂解液可以和其他 Caspase 活性检测试剂盒的细胞裂解液通用吗？

本公司 Caspase 系列试剂盒的细胞裂解液可以通用。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA3026	Caspase-9 活性分析试剂盒（比色法）
KTA3027	Caspase 3/7 活性细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）
KTA2010	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）
KTA0002	Annexin V-AbFluor™ 488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒
KTA0006	Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

Caspase-3活性分析试剂盒（比色法）

（Abbkine 货号 ： KTA3022）

