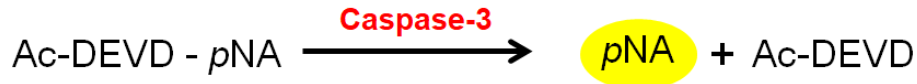


Caspase-3 Assay Kit-Colorimetric-

Technical Manual

概述

Caspase 是与细胞凋亡密切相关的重要的一组蛋白酶。其中 Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 因此 Caspase-3 经常被作为细胞凋亡的标志物来进行检测。同仁化学研发的 Caspase-3 Assay Kit-Colorimetric-是一套操作简单的比色法胞内 Caspase-3 活性检测试剂盒。与其他市面上的检测试剂盒相比, 由于具有更高的灵敏度, 因此可以在更短的培养时间内快速检测。通过比较凋亡组细胞和正常组细胞的 pNA 吸光度, 即可确定 Caspase-3 活性的增加倍率。



产品信息

Substrate	260 μl \times 2
Lysis Buffer	\times 1
Assay Buffer	\times 1
Reconstitution Buffer	14 ml \times 1

保存条件

0~5°C保存

所需设备和材料

- 酶标仪 (405 nm 滤光片)
- 培养箱 (37°C)
- 微管
- 离心机
- 超声波震荡仪
- 96 孔板
- 1-10 μl 和 20-200 μl 移液器
- 锥形管
- 蛋白质定量试剂 (Bradford 法)

注意事项

- 试剂盒内的 Lysis Buffer 和 Assay Buffer 在铝盖玻璃瓶内保存。使用时建议佩戴手套, 小心操作。由于瓶内的试剂无色且易吸附在内壁, 不易被观察到。加入 Reconstitution Buffer 后, 请充分颠倒混匀并置于超声波震荡仪中震荡 2 min 后再使用。
- 使用前请先将试剂盒内的试剂恢复至室温。
- 为了获得更准确的实验结果, 建议所有检测样品和对照组至少设置 3 个复孔。
- 为了避免 Caspase-3 失活, 样品应置于冰浴上。
- 调整蛋白质浓度时请使用 Bradford 法进行蛋白质定量。避免使用 BCA 等基于还原性物质的方法。
- 本试剂盒不包含 pNA 标准品, 如需制作 pNA 标准曲线, 请另行购买 pNA 标准品并以 200 $\mu\text{mol/l}$ 为最大浓度进行梯度稀释。

操作步骤

Lysis Buffer 的配制

向 Lysis Buffer 瓶中加入 10 ml Reconstitution Buffer 后超声波震荡 2 min。(建议使用注射器添加 Reconstitution Buffer。如不使用注射器, 请注意瓶内为真空状态, 剥除铝制封口和打开橡胶瓶盖时请小心操作。)

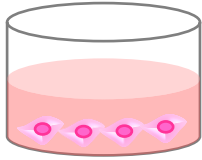
- * Lysis Buffer 配制好后需-20°C保存。
- * 配制好的 Lysis Buffer 在-20°C可稳定保存 1 个月。
- * 经测试, Lysis Buffer 反复冻融 8 次以内可正常使用。

Assay Buffer 的配制

向 Assay Buffer 瓶中加入 3 ml Reconstitution Buffer 后超声波震荡 2 min。(建议使用注射器添加 Reconstitution Buffer。如不使用注射器, 请注意瓶内为真空状态, 剥除铝制封口和打开橡胶瓶盖时请小心操作。)

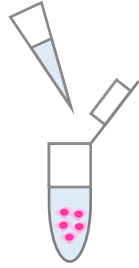
- * Assay Buffer 配制好后需-20°C保存。
- * 配制好的 Assay Buffer 在-20°C可稳定保存 1 个月。
- * 经测试, Assay Buffer 反复冻融 8 次以内可正常使用。

诱导凋亡



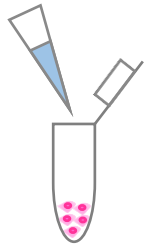
*请根据自己的实验条件诱导凋亡。

准备 $1-5 \times 10^6$ cells/ tube 细胞
并用 PBS 清洗一次



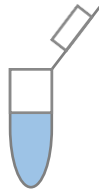
*建议细胞数量在 $1-5 \times 10^6$ cells/ tube 范围内。
*不同细胞系，最佳的细胞数量也不同，请根据具体实验摸索最佳细胞数。

加入 150 μ l Lysis Buffer



*150 μ l 细胞裂解液对应一个样品 (n=3)。
当复孔数大于 3 时，请增加 Lysis Buffer 的量，
但是不要改变细胞数量与 Lysis Buffer 的比例。
($1-5 \times 10^6$ cells/ 150 μ l Lysis Buffer)

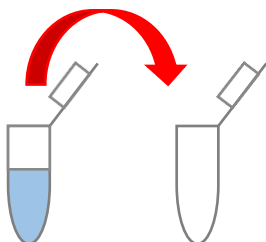
冰浴培养 15 min



*为了防止 Caspase-3 失活，置于冰浴培养。

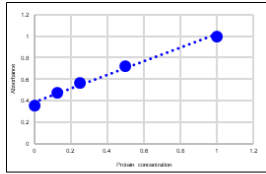
* 10,000 \times g, 1 min。

将上清液转移到新的离心管



*为了防止 Caspase-3 失活，置于冰浴上备用。

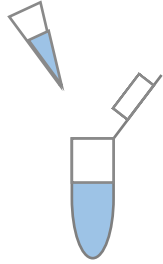
蛋白定量



*请使用 Bradford 法进行蛋白质定量。
避免使用 BCA 等基于还原性物质的方法。

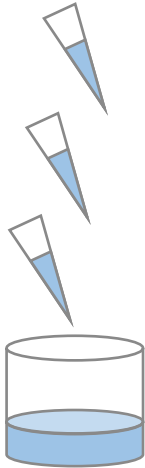


调整蛋白质的量至 1~3 mg/ml



*用 Lysis Buffer 调整蛋白质浓度至 1-3 mg/ml。

检测 Caspase-3 活性



1. 加入 10 μ l Substrate 至 96 孔板各孔中。
2. 加入 40 μ l Assay Buffer 至各孔中。
3. 加入 50 μ l 细胞裂解液或 Lysis Buffer (空白孔)至各孔中。
请参考下图的孔板布置。

	Blank	Non-treated cell	Treated cell
Substrate	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Assay Buffer	40 μ l	40 μ l	40 μ l
Lysis Buffer	50 μ l	-	-
Cell lysate	-	50 μ l	50 μ l

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank			Sample 8								
B	Sample 1			Sample 9								
C	Sample 2			Sample 10								
D	Sample 3			Sample 11								
E	Sample 4			Sample 12								
F	Sample 5			Sample 13								
G	Sample 6			Sample 14								
H	Sample 7			Sample 15								

4. 在 37°C 培养箱中培养 2 h。

*如果检测的吸光度值过低，可适当延长培养时间。(最长可过夜培养)

5. 用酶标仪检测 405 nm 处的波长。

实验例

1. 将 Jurkat 细胞 (3.38×10^6 Cells/ ml) 接种到两个 100 mm 培养皿中 (两个培养皿中分别含有 $0 \mu\text{mol/l}$ 和 $5 \mu\text{mol/l}$ Staurosporine 的 RPMI 培养基), 并在 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中 37°C 培养 5 小时。
2. 将细胞收集到两个不同的锥形管中并离心 ($300 \times g$, 3 min)。
3. 去除上清液后, 用 1 ml PBS 重悬细胞。
4. 离心 ($300 \times g$, 3 min) 后, 去除上清液。
5. 将 Lysis Buffer (200 μl) 加入至每个管中。
6. 将两个样品在冰上孵育 15 min。
7. 将两个样品离心 ($10,000 \times g$, 1 min)。
8. 将每个样品的上清液转移到新的微管中。
9. 通过 Bradford 法定量每个上清液中的蛋白质浓度。
10. 使用 Lysis Buffer 将每个样品的蛋白质浓度调节至 1.0mg/l 。
11. 将 Substrate (10 μl), Assay Buffer (40 μl) 和样品 (50 μl) 加入至 96 孔板中。
12. 37°C 培养 2 h。
13. 用酶标仪测定 405nm 处的吸光度。

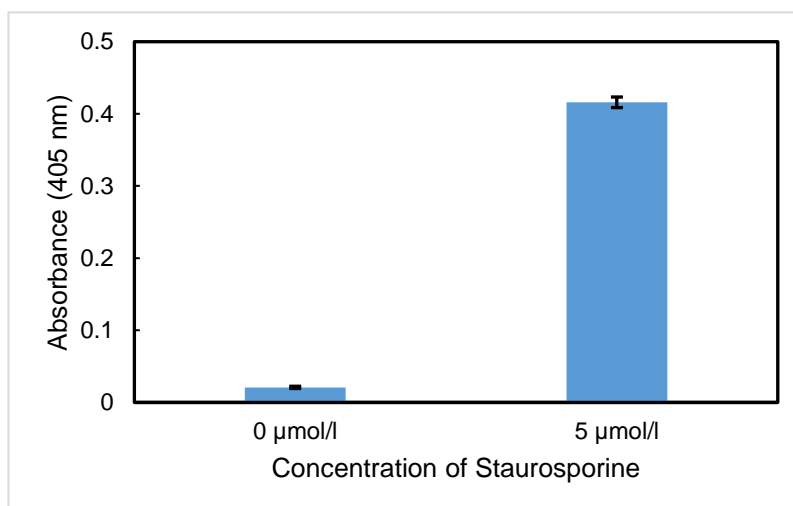


图. Jurkat 细胞中 Caspase-3 的活性(staurosporine treated/ -untreated)

关联产品

细胞凋亡检测试剂盒 (荧光法, 凋亡早期和晚期检测)

Annexin V, FITC Apoptosis Detection Kit (AD10)

Annexin V, 633 Apoptosis Detection Kit (AD11)

细胞周期检测试剂盒

Cell Cycle Assay Kit-PI/RNase Staining (C543)

细胞增殖毒性检测试剂盒

Cell Counting Kit-8 (CK04)

细胞毒性检测试剂盒

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (CK12)

活死细胞双染试剂盒

Calcein-AM/ PI Double Staining Kit (C542)

本产品仅供实验室研究使用, 不可用于临床诊断。如果您需要更多信息请通过下面的联系方式联系我们:

网址: www.dojindo.cn

东仁化学科技(上海)有限公司

上海市零陵路 899 号飞洲国际广场 27 楼 J 座

邮编: 200030

电话: 400-823-9388

E-mail: info@dojindo.cn

北仁化学科技(北京)有限公司

北京市朝阳区裕民路 12 号元辰鑫大厦 E1-210 室

邮编: 100029

电话: 010-8225-1765