



## Caspase-3/7 Z-DEVD-R110 Assay Kit

### ——细胞凋亡检测试剂盒

| 产品货号        | 包装规格         |
|-------------|--------------|
| <b>A044</b> | <b>100 次</b> |

储存条件：-20℃，避光保存。

激发/发射波长：R110: 496/520 nm

## 产品说明书

安迪福诺生物科技（武汉）有限公司

ABP Biosciences Inc

武汉市东湖新技术开发区高新大道666 号

光谷生物城生物创新园 C2-4 栋 5 楼

电话： 400-0667-718

邮箱： [sales@abpbio.cn](mailto:sales@abpbio.cn)

网址： [www.abpbio.com](http://www.abpbio.com) (英文)

[www.abpbio.com.cn](http://www.abpbio.com.cn) (中文)

## Caspase-3/7 Z-DEVD-R110 Assay Kit

产品货号: A044

## 试剂盒组份:

| 组份   | 名称                              | 体积          | 浓度                             | 储存温度        |
|------|---------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|
| 组份 A | Cell Lysis Buffer               | 10 ml       | 1×                             | -20 °C, 避光。 |
| 组份 B | Cell Assay Buffer               | 10 ml       | 1×                             |             |
| 组份 C | Enzyme Substrate<br>Z-DEVD-R110 | 250 $\mu$ l | 1 mM in DMSO                   |             |
| 组份 D | Enzyme Inhibitor<br>Ac-DEVD-CHO | 20 $\mu$ l  | 5 mM in DMSO                   |             |
| 组份 E | Standard R110                   | 1 ml        | 80 $\mu$ M in H <sub>2</sub> O |             |

注: 按照推荐的储存条件保存有效期为 6 个月。

## 产品介绍

细胞凋亡 (apoptosis) 指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序的死亡。它是细胞正常生理活动的一部分。细胞凋亡发生了不当调控很可能会引起疾病的发生, 比如阿尔茨海默氏症和癌症。细胞凋亡不同于细胞坏死, 主要表现在细胞形态学和生物化学上发生的变化, 包括细胞核染色质浓缩、细胞质收缩并产生胞膜的凋亡小体、基因组的断裂和几种细胞蛋白质的裂解和降解。

Caspase-3/7 Z-DEVD-R110 细胞凋亡试剂盒通过检测 Caspase-3 及其它以 DEVD 为特异性底物的蛋白酶活性来分析细胞凋亡情况。本试剂盒所采用的 Caspase-3 酶底物为一种罗丹明 110 双酰胺衍生物 (Z-DEVD-R110), 本身没有荧光。当该酶底物在活化的 Caspase-3 催化下, 可以分二步水解成罗丹明 110 (一种很强的绿色荧光染料)。根据释放的罗丹明 110 荧光强度大小可以测定 Caspase-3 活性。本试剂盒还包括蛋白酶抑制剂 Ac-DEVD-CHO, 用于观察细胞凋亡是否通过 Caspase-3/7 激活来介导。

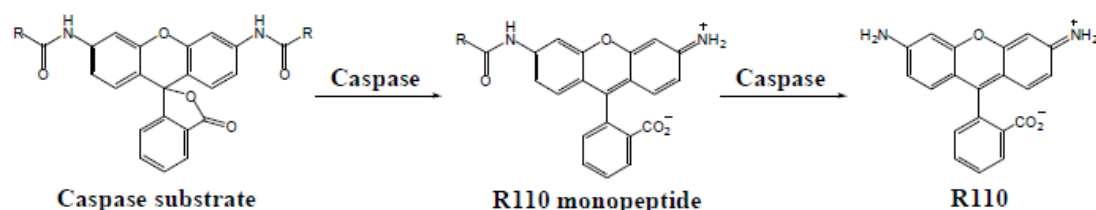


图 1: Caspase-3 酶底物在 Caspase 酶作用下分二步水解成罗丹明 110, 并释放绿色荧光信号。

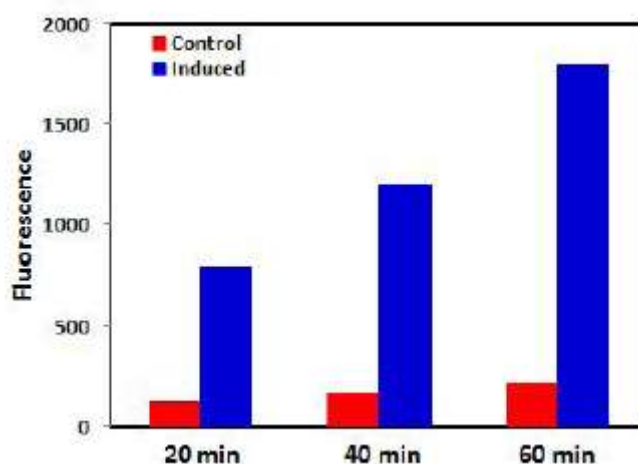


图 2: 用 Caspase-3/7 Z-DEVD-R110 细胞凋亡试剂盒 (货号: A044) 检测 Jurkat 细胞凋亡情况。使用 10  $\mu$ M 喜树碱处理 Jurkat 细胞 4 小时作为阳性实验组, 同时设置未处理组做阴性对照。按照操作说明收集、裂解细胞样本, 诱导、孵育一段时间之后在荧光酶标仪 (激发波长为  $470 \pm 10$  nm, 发射波长为  $520 \pm 10$  nm) 下进行荧光信号强度读数。

## 实验步骤

注意: 以下实验操作步骤以 96 孔板培养, 每孔 100 $\mu$ l 细胞培养液为例说明, 细胞培养液体积可根据实际需要进行调整。建议使用三个对照实验组: 1) 细胞未进行处理的阴性对照组; 2) 诱导剂诱导细胞凋亡的阳性对照组; 3) 使用诱导剂及 Caspase-3 抑制剂的回归对照组。

1. 将贴壁细胞铺到黑色的 96 孔酶标板中, 悬浮细胞可以铺到培养瓶或培养皿中;
2. 使用合适的诱导方法诱导细胞凋亡作为阳性对照实验组, 同时设定未处理的阴性对照组;
3. 细胞裂解;

悬浮细胞:

A) 将细胞平均地分到微型离心管或黑色的 96 孔酶标板中, 为了得到较好的实验结果, 建议每个反应孔的细胞数量至少为  $10^5 \sim 10^6$ ;

B) 400g 离心 5 分钟, 留细胞沉淀, 弃上清;

C) 使用 50 $\mu$ l 冷冻的 Cell Lysis Buffer 重悬细胞;

贴壁细胞:

A) 从 96 孔酶标板中吸走细胞培养液;

B) 每孔中加入 50 $\mu$ l 冷冻的 Cell Lysis Buffer;

4. 冰上孵育 30 分钟；
5. 将细胞裂解液转移到微型离心管中，4°C，以最大转速离心 5 分钟，收集不可溶的细胞碎片。转移上清至新的微型离心管。
6. (可选) 为了确证检测到的荧光信号是由 Caspase-3 活性引起，在添加蛋白酶底物之前使用 Caspase-3 抑制剂与细胞样本进行孵育反应。加入 1  $\mu$ l 5 mM 蛋白酶抑制剂 Ac-DEVD-CHO (组份 D)，室温孵育 10 分钟。未加入抑制剂的其余样本应置于冰上保存。
7. 准备蛋白酶底物工作液。取 50  $\mu$ l 的 1 mM 蛋白酶底物 Z-DEVD-R110 (组份 C) 加入到 950  $\mu$ l Assay Buffer (组份 B)，混合均匀。
8. 每个实验样本中加入 50  $\mu$ l 蛋白酶底物工作液，混匀。37°C 孵育 30~60 分钟，不要超过 3 小时。
9. 在 460nm 的激发波长及 520nm 的发射波长下检测荧光信号。

#### (可选) R110 标准曲线制备

1. 使用细胞裂解液将 80  $\mu$ M 的 R110 稀释到 20  $\mu$ M。再将 20  $\mu$ M 进行 2 倍比系列稀释成 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 和 0.156  $\mu$ M。使用细胞裂解液作为 0  $\mu$ M 空白对照。取 100  $\mu$ l 每个系列稀释的浓度梯度从 20  $\mu$ M 到 0  $\mu$ M 依次加到 96 孔酶标板中。
2. 在 470nm 的激发波长及 520nm 的发射波长下检测荧光信号。使用 0  $\mu$ M 空白对照的荧光信号读值作为背景信号，计算其他反应孔的相对荧光信号读值 (RFU)。
3. 根据 R110 浓度绘制相对荧光信号读值 (RFU)，生成标准曲线。

**注意：**荧光信号读值的动力学范围主要依赖于蛋白酶底物的切割活性，不一定成线性关系。蛋白酶底物的切割包括两步反应，中间步骤及终点产物产生的荧光信号强度不一样。因此，R110 标准曲线可以用于终点定量，而不能用于动态学研究。