

中 文 说 明 书

Caspase-Glo® 3/7 Assay

适用产品目录号： G8090、G8091、G8092 和 G8093

2021 版 CTB323
原英文技术手册 TB323

Caspase-Glo® 3/7 Assay

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/ protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱：chinatechserv@promega.com

1. 描述 2
2. 产品组分和储存条件 4
3. 试剂制备和储存 6
4. 细胞检测中 Caspase-3 和 Caspase-7 活性的检测 6
   - 4. A. 检测条件 7
   - 4. B. 采用 96 孔板培养的细胞的标准检测方案 10
   - 4. C. 采用康宁® 球形微孔板培养的 3D 微组织的标准检测方案 10
5. 采用纯化半胱天冬酶进行 Caspase-3 或 Caspase-7 活性检测 11
   - 5. A. 检测条件 11
   - 5. B. 半胱天冬酶纯酶的标准检测方案 12
6. 一般注意事项 17
7. 相关产品 19
8. 内容变更总结 21

1. 描述

Caspase-Glo®3/7 检测系统 [a,b] 是一种用来检测 Caspase-3 和 Caspase-7 活性的均相发光检测系统。该系统所含试剂（针对半胱天冬酶活性、萤光素酶活性和细胞裂解进行了优化）中有一种 caspase-3/7 发光底物，底物中含四肽序列 DEVD。在“加样 - 混合 - 检测”模式下，仅需添加一种 Caspase-Glo®3/7 试剂，就能实现细胞裂解。随后半胱天冬酶将底物剪切，并在萤光素酶作用下产生“辉光型”发光信号（图 1）。发光值与半胱天冬酶的活性成正比（图 2）。Caspase-Glo®3/7 试剂依赖获得专利的耐热萤光素酶（Ultra-Glo™ 重组萤光素酶）的特性，试剂可产生稳定的“辉光型”发光信号，并在不同检测条件下提高检测灵敏度。

Caspase-Glo®3/7 检测系统适用于多孔板检测，成为对半胱天冬酶活性或细胞凋亡进行自动高通量筛选的理想之选。目前该检测系统可采用 96、384 和 1536 孔板进行自动筛选。无需进行细胞清洗、培养基移除和多次移液等操作步骤（图 3）。约在 1 小时内半胱天冬酶和萤光素酶活性达到稳态，发光信号达到最强，并在随后数小时内保持最小信号损失（图 5 和图 6），使得 caspase-3/7 活性检测更加快速、灵敏且灵活。已采用纯酶制剂（图 2）和多种细胞模型系统对该检测系统的功能进行了验证，此类细胞模型包括单层培养的贴壁细胞或悬浮细胞（图 5）、3D 微组织培养物（图 10）和斑马鱼胚胎。此外，在暴露于几种不同药物和凋亡诱导剂（抗 Fas、TNF-α、星孢菌素、氯氮平、长春花碱和他莫昔芬）的多种细胞系（Jurkat、L929、HeLa、HL-60、SH-SY5Y 和 HepG2）中对该检测系统进行了验证。该检测系统可与其他均相检测系统联合使用，来测量单孔中的多个参数（图 8）。

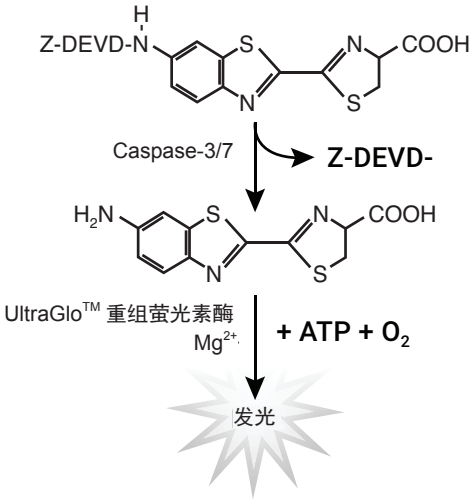


图 1. Caspase-Glo®3/7 检测技术示意图。前体萤光素 DEVD 底物经半胱天冬酶剪切后，会释放出萤光素酶的底物（氨基萤光素），并在萤光素酶和 ATP 的作用下发生生物发光反应，产生发光信号。

普洛麦格（北京）生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：800 810 8133（座机拨打），400 810 8133（手机拨打）
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTB323
2021 制作

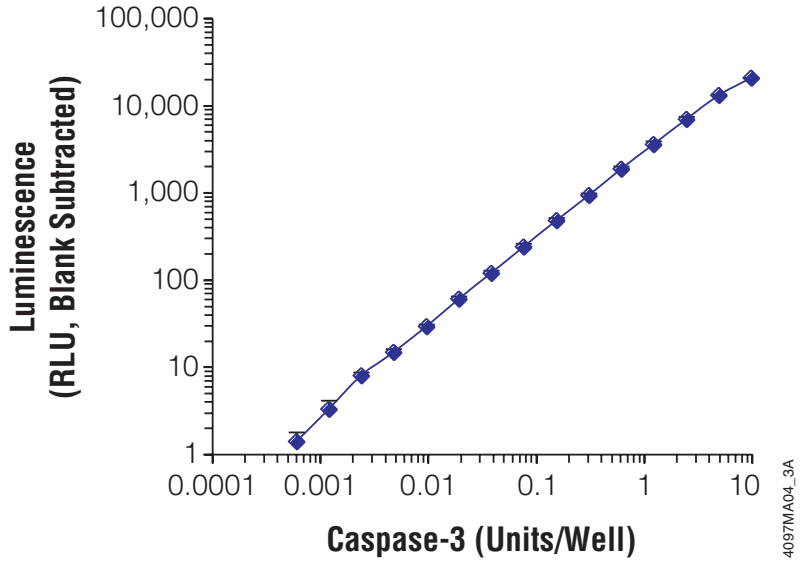


图 2. 发光值与 caspase-3 活性成正比。采用 96 孔板，以 200µL/ 孔的总体积对 Caspase-3 纯酶进行滴定和检测。加入 Caspase-Glo®3/7 试剂 1 小时后，读取发光检测仪读数。检测结果在半胱天冬酶浓度的 4 个数量级范围内呈线性（R^2 = 0.998，斜率 = 0.989）[1]。根据制造商规定的单位，一个单位的半胱天冬酶（0.07ng 蛋白）是指在 30°C条件下 1 分钟内剪切 1pmol 水解底物（Ac-DEVD-pNA）所需的酶量 [2]。每个点代表 4 个孔的平均发光值。数值为减去空白后的取值（空白 = 无半胱天冬酶）。

[1] 通过将对数图转换为 $\log_{10}$ 线性图来计算 r^2 和斜率的方式来确定检测结果。

[2] 不同生产商对 caspase-3 活性单位的定义不同，因此供应商之间不会直接转换活性单位数量。注意：1) 由于 Caspase-Glo®3/7 检测系统的动态变化范围较广，因此采用对数标度绘制数据图表。2）相对光单位（RLU）的数量取决于所使用发光检测仪的类型。鉴于此原因及单位定义差异，所得结果可能不同。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 3/7 Assay	**2.5ml**	**G8090**

每个系统所含试剂足够在 96 孔板中进行 25 次检测（每次 100µl）或在 384 孔板中进行 100 次检测（每次 25µl）。包括：

- 1 × 2.5ml Caspase-Glo® 3/7 Buffer
- 1 bottle Caspase-Glo® 3/7 Substrate (lyophilized)

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 3/7 Assay	**10ml**	**G8091**

每个系统所含试剂足够在 96 孔板中进行 100 次检测（每次 100µl）或在 384 孔板中进行 400 次检测（每次 25µl）。包括：

- 1 × 10ml Caspase-Glo® 3/7 Buffer
- 1 bottle Caspase-Glo® 3/7 Substrate (lyophilized)

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 3/7 Assay	**10 × 10ml**	**G8093**

每个系统所含试剂足够在 96 孔板中进行 1000 次检测（每次 100µl）或在 384 孔板中进行 4000 次检测（每次 25µl）。包括：

- 10 × 10ml Caspase-Glo® 3/7 Buffer
- 1 bottle Caspase-Glo® 3/7 Substrate (lyophilized)

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 3/7 Assay	**100ml**	**G8092**

每个系统所含试剂足够在 96 孔板中进行 1000 次检测（每次 100µl）或在 384 孔板中进行 4000 次检测（每次 25µl）。包括：

- 1 × 100ml Caspase-Glo® 3/7 Buffer
- 1 bottle Caspase-Glo® 3/7 Substrate (lyophilized)

储存条件：将 Caspase-Glo®3/7 底物和 Caspase-Glo®3/7 缓冲液避光储存于 -20˚C条件下。Caspase-Glo®3/7 缓冲液可解冻后于 4˚C条件下储存 3 个月，或在室温条件下储存 4 天，不会造成信号损失。有关产品失效日期，请参见产品标签。

普洛麦格（北京）生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：800 810 8133（座机拨打），400 810 8133（手机拨打）
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTB323
2021 制作

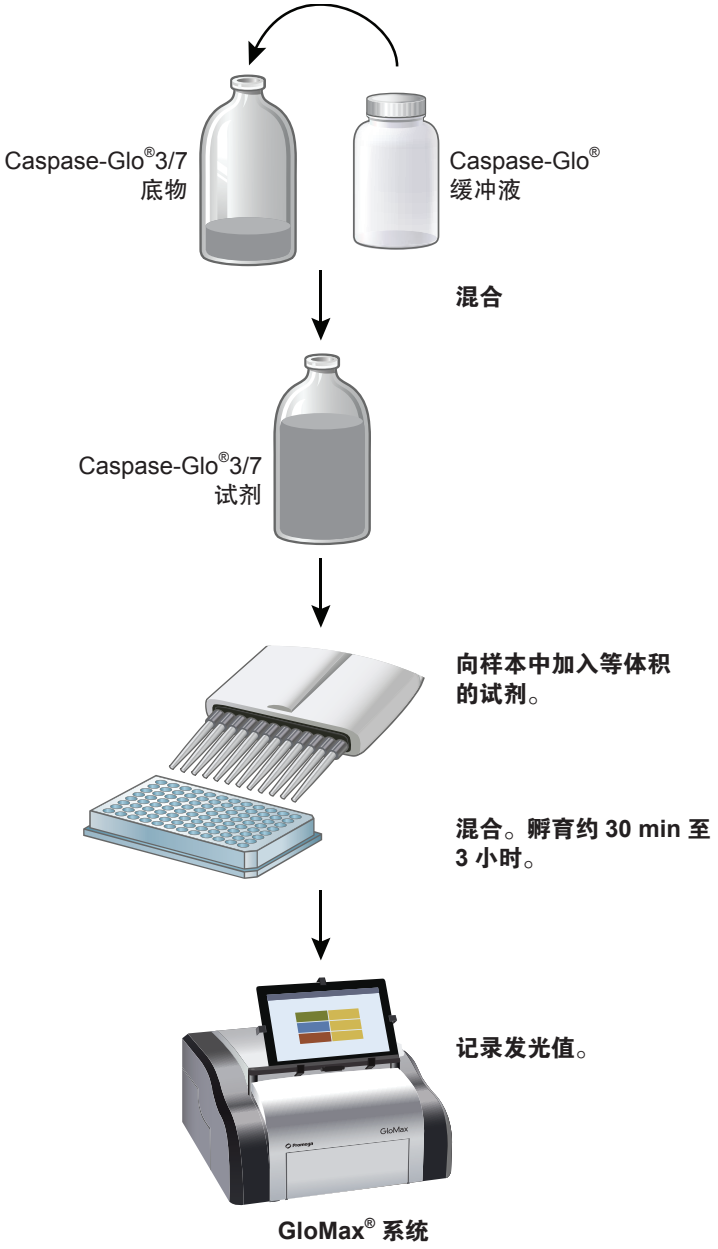


图 3. Caspase-Glo®3/7 检测操作步骤示意图。

3. 试剂制备和储存

1. 在实验前，将 Caspase-Glo®3/7 缓冲液和 Caspase-Glo®3/7 冻干底物平衡至室温。
2. 将 Caspase-Glo®3/7 缓冲液倒入装有 Caspase-Glo®3/7 底物的棕色瓶中。旋转或颠倒混匀，直到底物完全溶解，形成 Caspase-Glo®3/7 试剂。G8090 的缓冲液体积是 2.5ml；G8091 和 G8093 的缓冲液体积是 10ml；G8092 的缓冲液体积是 100ml。

储存：复溶的 Caspase-Glo®3/7 试剂可在 4℃条件下储存长达 3 天，与新制试剂相比，无活性损失。于 4℃条件下储存 1 周的复溶试剂所产生的信号值约为新制试剂的 90%左右，于 4℃条件下储存 4 周的复溶试剂所产生的信号值约为新制试剂的 75%左右。再次冷冻并于–20℃条件下储存 1 周的复溶试剂所产生的信号值约为新制试剂的 75%左右，在–20℃条件下储存 4 周的再次冷冻试剂所产生信号值约为新制试剂的 60%左右。

4. 细胞检测中 Caspase-3 和 Caspase-7 活性的检测

本手册介绍了使用 96 孔板进行检测（试剂总体积为 200µl）的操作说明。可对该检测方法的体积进行适当调整，但应保持所用 Caspase-Glo®3/7 试剂与样品体积的比例为 1:1（例如，在 384 孔板中，样品体积和 Caspase-Glo®3/7 试剂体积均为 25µl）。

用户提供的材料

- 适用于细胞培养且与所用发光检测仪兼容的孔壁不透光多孔板，如康宁® 微孔板（产品目录号 3917）
- 多通道移液器或自动移液站
- 多孔板混匀用孔板振荡器
- 能够读取多孔板的发光检测仪

普洛麦格（北京）生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：800 810 8133（座机拨打），400 810 8133（手机拨打）
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTB323
2021 制作

4.A. 检测条件

准备以下反应，以检测细胞培养物中的 caspase-3 和 -7 活性。在适用于细胞培养且与所用发光检测仪兼容的多孔板中培养细胞。“Vehicle”指用于溶解药物或靶蛋白的溶剂。

- 空白反应组：Caspase-Glo®3/7 试剂、vehicle 和不含细胞的细胞培养基
- 阴性对照组：Caspase-Glo®3/7 试剂和培养基中经 vehicle 处理的细胞
- 实验组：Caspase-Glo®3/7 试剂和培养基中经待测物处理的细胞

空白反应用于测定细胞培养系统中 Caspase-Glo®3/7 试剂存在情况下的背景发光值。计算时从实验值中减去空白值。阴性对照反应对于测定细胞培养系统中的半胱天冬酶基础活性具有重要意义。

由于该检测系统的灵敏度较高，可在血清及未处理细胞中检测到半胱天冬酶的背景活性。在处理多块检测用微孔板时，在每个微孔板中进行阳性和阴性对照反应。

由于 Caspase-Glo®3/7 检测系统的灵敏度较高，应注意避免被含半胱天冬酶或萤光素的溶液污染。

注意：

1. 需要根据经验确定细胞培养系统的最佳细胞数量或微球组织体积、凋亡诱导处理条件和试剂孵育时间。推荐在 96 孔板中每孔使用 <20000 个细胞。
2. 实验孔和阴性对照孔的细胞数量和体积要完全相同。
3. 检测所需要的总孵育时间因培养系统而异，但发光信号值一般在 1-2 小时内达到峰值。为获得最理想的结果，建议孵育时间最长为 3 小时。通常情况下，在 3 小时时发光信号值大于峰值的 70%（图 5B 和 6B）。

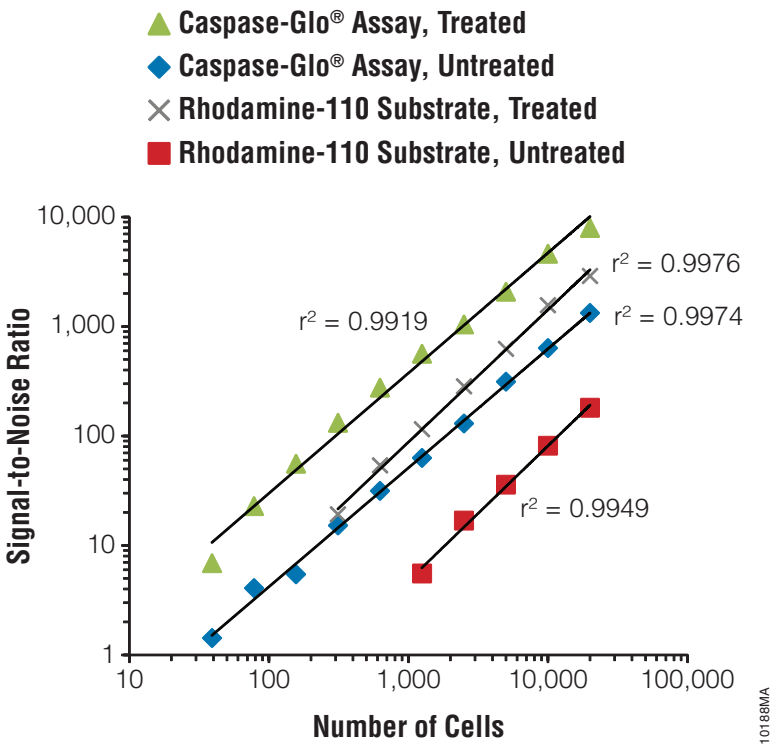


图 4. 半胱天冬酶生物发光检测和荧光检测的比较。在 OptiMEM® (Gibco)+ 1% 胎牛血清（Hyclone）培养基中培养 HeLa 细胞。将细胞铺板于 96 孔板中，并用 1µM 星孢菌素处理 4.5 小时或不处理。向孔中加入 Caspase-Glo®3/7 试剂和 Rhodamine-110 底物，一小时后用 GloMax®Multi+ 系统分别读取发光值和蓝色荧光通道（490nm$_{Ex}$，510–570nm$_{Em}$）的荧光值。以信噪比形式记录结果。测定无细胞培养基孔的读数作为背景值读数。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：800 810 8133(座机拨打)，400 810 8133(手机拨打)
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTB323
2021 制作

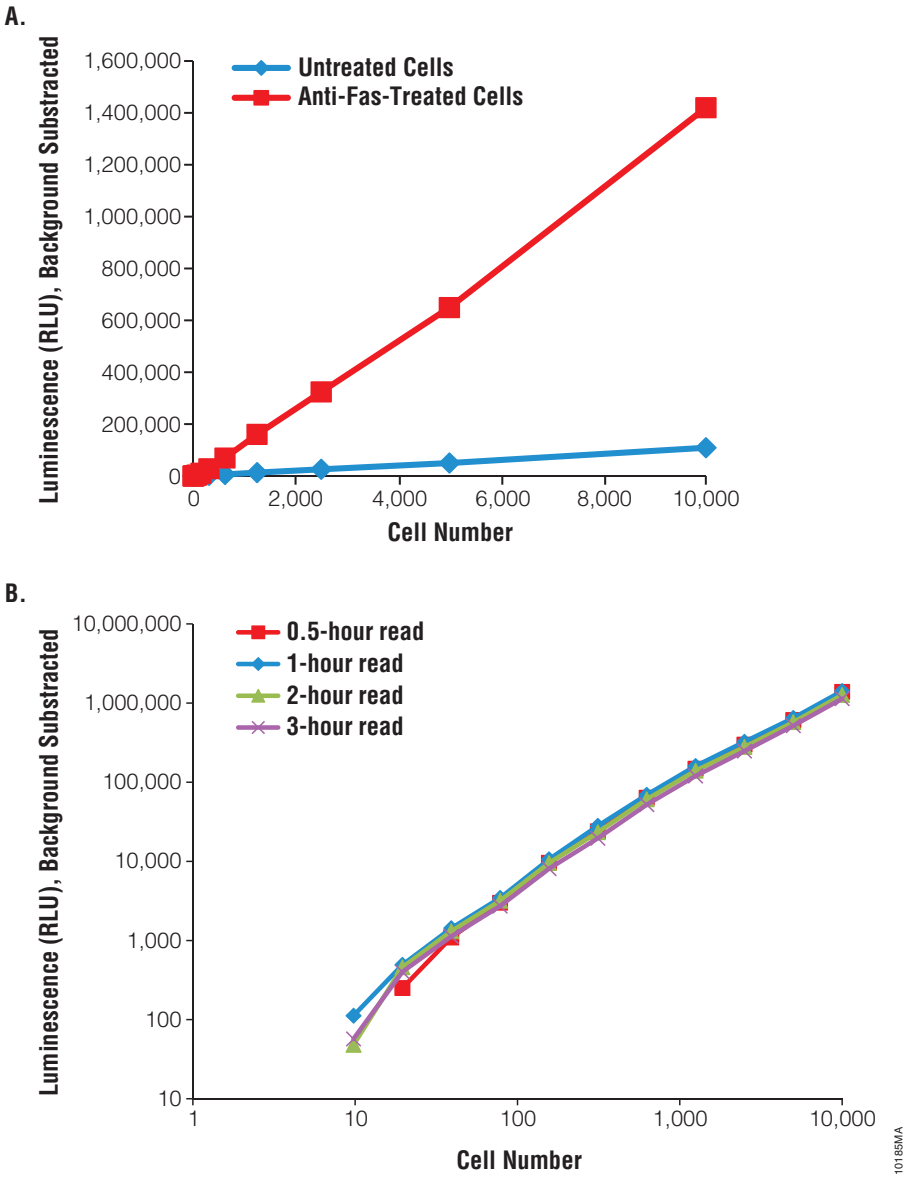


图 5. 凋亡 Jurkat 细胞中半胱天冬酶活性的敏感性和信号稳定性。采用抗 Fas mAb (14,15) 处理 Jurkat 细胞 4.5 小时，诱导细胞凋亡；另有同样数量的细胞不予处理。将 Caspase-Glo®3/7 试剂直接加入 96 孔板的细胞中；最终体积为 200µL/ 孔。用 GloMax®Multi+ 发光检测仪读取发光值前，在室温下以不同时长孵育检测系统。每个点代表 4 个孔的平均发光值。从每个点减去“无细胞”空白对照值。试板 A. 加入 Caspase-Glo®3/7 试剂 1 小时后，读取发光检测仪读数。试板 B. 在加入 Caspase-Glo®3/7 试剂后的不同时间点读取发光检测仪读数。未显示未经处理细胞的相关数据。注意：由于 Caspase-Glo® 3/7 检测系统的动态变化范围较广，因此采用对数标度绘制试板 B 的数据图表。

4.B. 采用 96 孔板培养的细胞的标准检测方案

1. 检测开始前，制备 Caspase-Glo®3/7 试剂（请参见第 3 节）。使试剂平衡至室温，混匀。
2. 从培养箱中取出培养细胞的 96 孔板，使其平衡至室温。
3. 向含 100µl 空白对照、阴性对照细胞或经处理细胞的白色不透明 96 孔板的各孔中加入 100µl Caspase-Glo®3/7 试剂。由于该检测系统的灵敏度较高，应注意不要使吸液头接触含有样品的孔，避免交叉污染。用封板膜或盖子盖住微孔板。

   注意：如需重复使用吸液头，应注意不要使吸液头接触含有样品的孔，避免交叉污染。
4. 使用孔板振荡器以 300-500 rpm 的转速轻柔混匀微孔内容物 30 秒。在室温下孵育 30 分钟至 3 小时，时间长短取决于细胞培养系统。应根据经验确定细胞培养系统的最佳孵育时间。

   注意：温度波动会影响发光值读数。如果室温存在波动，请使用恒温培养箱。参见第 6 节。
5. 根据发光检测仪制造商提供的操作说明，使用微孔板发光检测仪测定各样品的发光值。

4.C. 采用康宁® 球形微孔板培养的 3D 微组织的标准检测方案

1. 检测开始前，制备 Caspase-Glo®3/7 试剂（请参见第 3 节）。使试剂平衡至室温，混匀。
2. 从培养箱中取出培养细胞的检测板，使其平衡至室温。
3. 加入与孔中培养基等体积的 Caspase-Glo®3/7 试剂。

注意：如需重复使用吸液头，应注意不要使吸液头接触含有样品的孔，避免交叉污染。

4. 使用孔板振荡器以 300-500 rpm 的转速轻柔混匀微孔内容物 5 分钟。在室温下孵育 30 分钟至 3 小时，时间长短取决于细胞培养系统。应根据经验确定细胞培养系统的最佳孵育时间。

   注意：温度波动会影响发光值读数。如果室温存在波动，请使用恒温培养箱。参见第 6 节。
5. 根据发光检测仪制造商提供的操作说明，使用微孔板发光检测仪测定各样品的发光值。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：800 810 8133(座机拨打)，400 810 8133(手机拨打)
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTB323
2021 制作

5. 采用纯化半胱天冬酶进行 Caspase-3 或 Caspase-7 活性检测

本手册介绍了使用 96 孔板进行检测（试剂总体积为 200µl）的操作说明。可对该检测方法的体积进行适当调整，但应保持所用 Caspase-Glo®3/7 试剂与样品体积的比例为 1:1（例如，在 384 孔板中，样品体积和 Caspase-Glo®3/7 试剂体积均为 25µl）。

用户提供的材料

- 孔壁不透光多孔板
- 多通道移液器或自动移液站
- 多孔板混匀用孔板振荡器
- 能够读取多孔板的发光检测仪
- Caspase-3 或 -7 纯酶（例如，ENZO 目录号：BML-SE169）

5.A. 检测条件

在适用于发光检测仪的多孔板上准备以下反应，以检测 caspase-3 或 -7 纯酶活性或活性抑制。“Vehicle”是指用于溶解待测化合物的溶剂。

- 空白反应：Caspase-Glo®3/7 试剂和酶处理剂或抑制剂的溶剂对照（如使用）
- 阳性对照组：Caspase-Glo®3/7 试剂、vehicle 对照和 Caspase-3 或 -7 纯酶
- 实验组：Caspase-Glo®3/7 试剂、待测化合物和 Caspase-3 或 -7 纯酶

空白反应用于测定 Caspase-Glo®3/7 试剂存在情况下与供试化合物的 vehicle 的背景发光值。应从实验值中减去空白反应发光值。阳性对照用于测定采用纯酶所获得的最大发光值。在处理多块检测用微孔板时，在每个微孔板中进行阳性和阴性对照反应。

注意：

1. 需要根据经验确定半胱天冬酶的最佳浓度和处理 vehicle。通常情况下，建议每个孔中的 caspase-3 纯酶质量 < 1 ng。
2. 实验组和阳性对照组采用相同的酶浓度。
3. 不同制造商对半胱天冬酶特异活性和单位的定义可能存在差异。需要根据所用半胱天冬酶的特异活性，优化按重量使用半胱天冬酶的使用说明。

5.B. 半胱天冬酶纯酶的标准检测方案

1. 检测开始前，制备 Caspase-Glo®3/7 试剂（请参见第 3 节）。使试剂平衡至室温，混匀。
2. 准备第 5.A 节所述的空白反应，并制备阳性对照和待测化合物组：向适用于发光检测仪且孔壁不透光的 96 孔板的每个孔中加入 100 µl vehicle、溶于 vehicle 的纯酶或含待测化合物的纯酶。

   注意：如需重复使用吸液头，应注意不要使吸液头接触含有样品的孔，避免交叉污染。
3. 向各孔样品中加入 100 µl Caspase-Glo®3/7 试剂。如果孵育时间过长（> 1 小时），可用封板膜覆盖平板。

   注意：温度波动会影响发光值读数。如果室温存在波动，请使用恒温培养箱。参见第 6 节。
4. 使用孔板振荡器轻柔混匀微孔内容物。在室温下孵育。

   注意：

   1. 约 20-60 min 内发光信号达到最强，并在接下来数小时内保持稳定（见图 6）。采用纯酶而非细胞进行检测时，通常更早达到发光值峰值。通常情况下，在发光值峰值出现 2 小时后发光信号值约为峰值的 70%。为获得最理想的结果，建议孵育时间最长为 3 小时。
   2. 使用孔板振荡器轻柔混匀内容物。并非必须混匀内容物，但混匀可提高重复样品之间的重现性。
5. 根据发光检测仪制造商提供的操作说明，使用微孔板发光检测仪测定各样品的发光值。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：800 810 8133(座机拨打)，400 810 8133(手机拨打)
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTB323
2021 制作

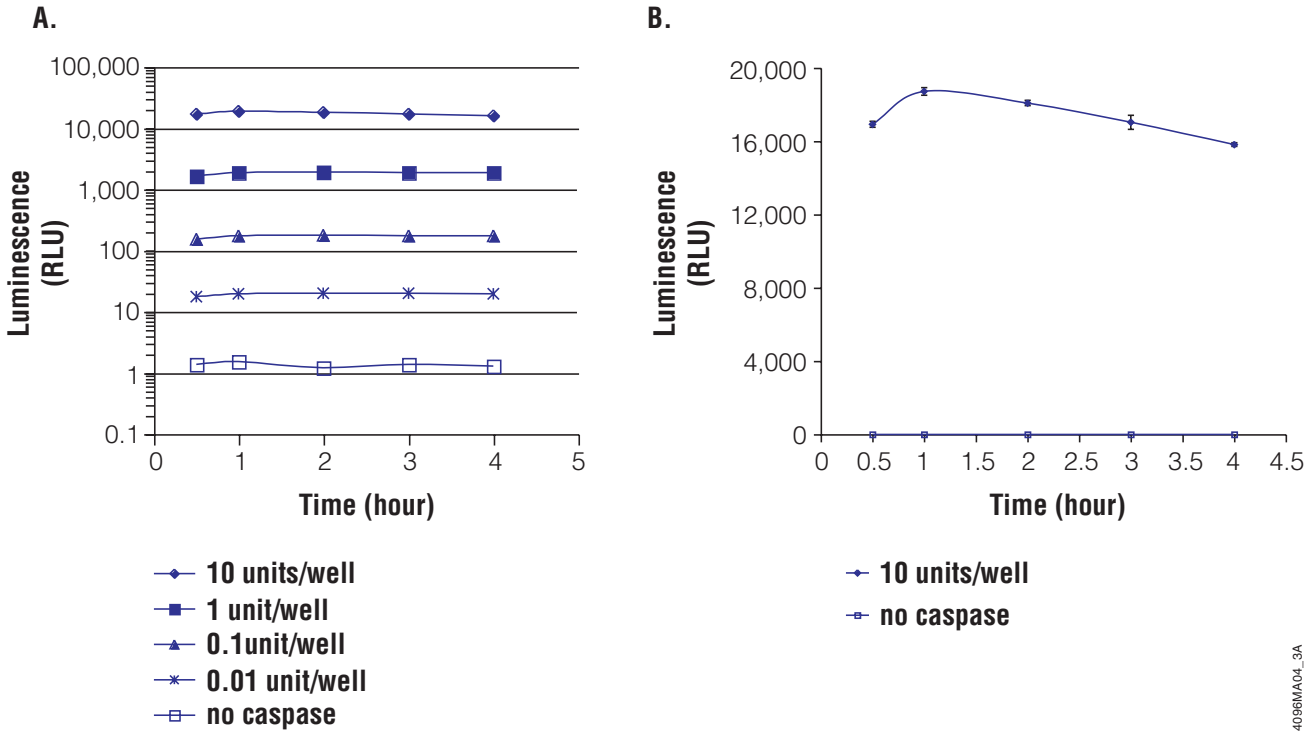


图 6. 使用 caspase-3 纯酶的信号稳定性。采用 Caspase-Glo®3/7 检测系统在 96 孔板上以 200µl/ 孔的总体积对 Caspase-3 纯酶进行滴定和检测。以含 0.1% Prionex®（作为载体）的 10 mM HEPES 缓冲液稀释 Caspase-3。根据制造商规定的单位，一个单位的半胱天冬酶（0.1ng 蛋白）是指在 30˚C 条件下 1 分钟内剪切 1pmol 水解底物（Ac-DEVD-pNA）所需的酶量。**试板 A.** 以对数图的方式绘制各浓度数据图表。**试板 B.** 采用线性标度描述每孔 10 个单位 caspase-3 生成的数据。

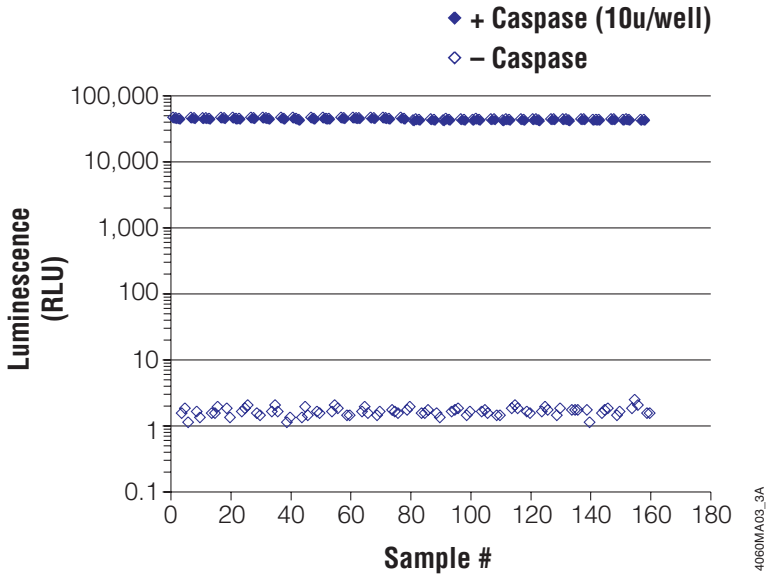


图 7. Z'- 因子分析。使用重组 Caspase-3（10 u/ 孔）和无半胱天冬酶空白对照计算 Caspase-Glo®3/7 检测系统的 Z'- 因子值 (11)。在两块 96 孔板（80 孔 / 板）上进行检测（总体积为 200µl）。每个板上的一半孔含有缓冲液和半胱天冬酶纯酶 (+)，另一半孔仅含有缓冲液，不含半胱天冬酶纯酶 (-)。该检测系统中 Z'- 因子 = 0.92。【根据制造商规定的单位，一个单位的半胱天冬酶（0.1ng 蛋白）是指在 30˚C条件下 1 分钟内剪切 1pmol 水解底物（Ac-DEVD-pNA）所需的酶量】。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：800 810 8133(座机拨打)，400 810 8133(手机拨打)
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTB323
2021 制作

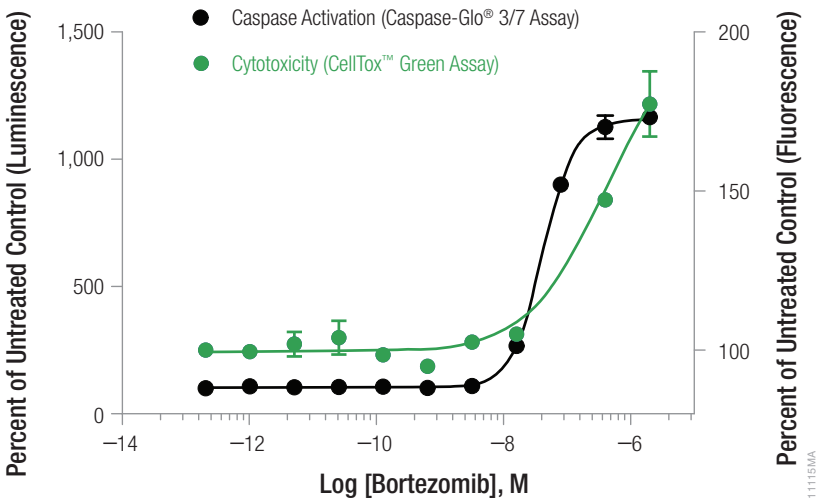


图 8. 在动力学模式下进行多重检测，以确定毒性机制。铺板时向细胞中加入 CellTox™ 绿色染料，并采用硼替佐米进行处理。在首次出现细胞毒性时（24 小时）加入 Caspase-Glo®3/7 试剂作为细胞凋亡指示剂（发光值）。半胱天冬酶活化程度提高并伴有细胞毒性，表明细胞毒性是细胞凋亡的结果。

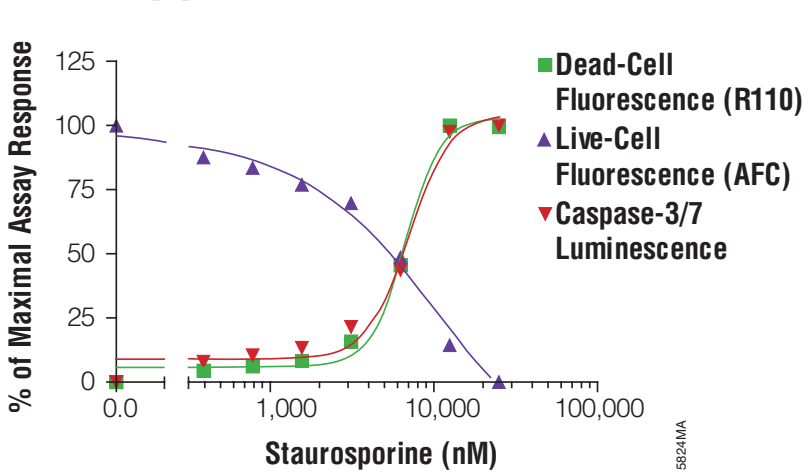


图 9. Caspase-Glo®3/7 检测系统可与 MultiTox-Fluor 检测系统联合使用，以确认细胞死亡机制。在 50 µl MEM + 10% 胎牛血清中，以每孔 10000 个细胞的密度接种 LN-18 细胞，附着过夜。将星孢菌素倍比稀释，并向上述孔中加入 50 µl 稀释液。在 37˚C条件下于 5% CO_2 中孵育 6 小时。将 10µl 各底物与 1ml 缓冲液混合，制备 MultiTox-Fluor 试剂，每孔加入 10µl 混合液。在 37˚C条件下混匀，并孵育 30 分钟。使用 BMG PolarStar 微孔板读数仪在 $400_{Ex}/505_{Em}$ 和 $485_{Ex}/520_{Em}$ 处测定荧光值。然后再加入 100µl Caspase-Glo®3/7 试剂，孵育 10 分钟后测定发光值。将所得信号归一化至最大响应百分比，并使用 GraphPad Prism® 软件绘图。

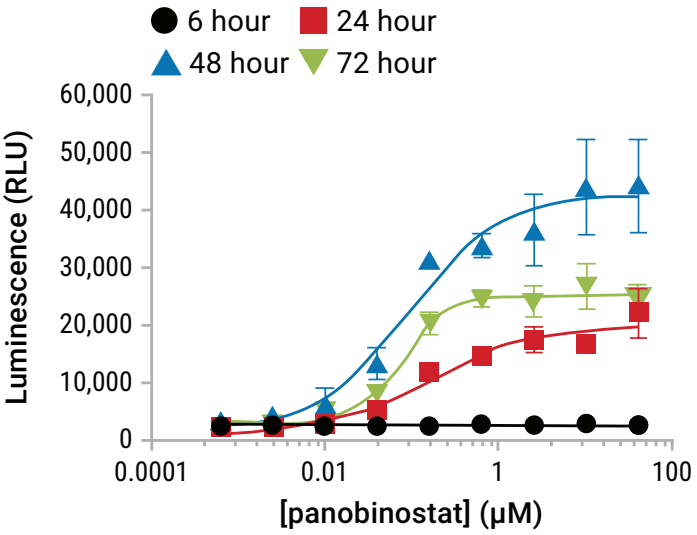


图 10. 在时程实验中采用帕比司他进行 3D 微球组织处理。采用 InSphero GravityPLUS™ 悬滴培养系统培养 HCT116 细胞，然后采用帕比司他持续处理 72 小时。在指定时间点，向孔中加入 Caspase-Glo®3/7 试剂，振摇 30 分钟，然后读取发光值。每个时间点使用单独的孔。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：800 810 8133(座机拨打)，400 810 8133(手机拨打)
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTB323
2021 制作

6. 一般注意事项

灵敏度

在荧光检测中，荧光底物（如 Z-DEVD-AMC）被蛋白酶裂解，释放的荧光体表现出激发 / 发射波长偏移。因此，裂解前后底物的发射光谱可能存在一些重叠，产生了大量的固有背景。在裂解并释放氨基萤光素前，前体发光底物（Z-DEVD-氨基萤光素）不能作为萤光素酶的底物；因此，固有背景不显著（图 4）。

低背景导致信背比较高（见图 7）。低背景还导致检测的线性范围较广，约为 4 个数量级的半胱天冬酶浓度（见图 2），并允许在低至 20 个凋亡细胞中检测半胱天冬酶活性（见图 4）。鉴于较高的信背比和较广的线性范围，通常需要采用对数标度绘制数据图表（见图 2-7）。建议在 96 孔板中每孔使用 <20000 个细胞，或每个孔中的 caspase-3 纯酶质量 < 1 ng，以维持最佳信号稳定性。

由于该检测系统的灵敏度较高，可在胎牛、马和小牛血清中检测 caspase-3 和 -7 活性。半胱天冬酶抑制剂 Ac-DEVD-CHO 和 Z-VAD-FMK 以剂量依赖性方式对检测中血清产生的发光信号进行抑制。当使用含血清培养基培养的细胞进行检测时，强烈建议在未经处理的对照之外，采用“无细胞”对照，以解释血清单独产生的信号。从经处理和未经处理细胞产生的信号值中减去“无细胞”对照信号值。

与荧光检测不同，Caspase-Glo®3/7 检测系统的最佳灵敏度使其不依赖于孵育时间的延长来蓄积裂解产物。因此，当半胱天冬酶和萤光素酶活性达到稳态时，检测系统达到最佳灵敏度。通常在 1 小时内出现。由于所用细胞培养系统不同，检测系统达到稳态所需的时间也会各异。

温度

Caspase-Glo®3/7 检测系统的发光信号强度和衰减速率取决于半胱天冬酶活性的降低速率和萤光素酶的反应速率。影响萤光素酶反应速率的环境因素也会对光输出信号强度和发光信号的稳定性造成影响。温度会影响此酶法检测的速率，因此也会影响光输出信号。为获得一致结果，在进行检测前，将检测板平衡至恒定温度。对于多块检测板的批处理模式，每块板均应包括阳性和阴性对照。此外，还应采取相应措施以确保已完全平衡至所需温度。从 37°C培养箱中取出孔板后，在室温条件下堆叠放置的孔板比单层放置的孔板所需的平衡时间更长。

化学品

萤光素酶反应的化学环境会影响酶活性，因此也会影响发光强度。已观察到使用不同类型培养基和血清所得的发光值存在差异。用来溶解各种化合物的溶剂可能会影响萤光素酶反应，因此也会影响检测方法的光输出信号。二甲基亚砜（DMSO）通常用作溶解有机化学品的溶剂，已在试验中以高达 10% 的最终浓度进行了检测，发现对光输出的影响极小。

混合

加入 Caspase-Glo®3/7 试剂进行纯酶检测时，混合虽不是必须的，但可能会提高孔间重现性。建议与培养细胞或 3D 微组织进行混合检测，以促进细胞裂解和 Caspase-3/7 的释放。

发光检测仪

对于灵敏度要求很高的发光检测方法，发光检测仪型号和设置均会对所得数据质量造成极大影响。不同制造商生产的发光检测仪灵敏度和动态范围均存在一定差异。如果使用的不是 GloMax® 发光检测仪，请查阅发光检测仪操作手册以确定最佳设置。在分析实验样品前，应确认每种仪器的检测限度。检测方法在所用仪器检测范围的某一段应呈线性。同一发光检测仪可能会有不同的增益 / 灵敏度设置，建议对增益 / 灵敏度设置进行优化，

我们推荐使用 GloMax® 系列发光检测仪。这些仪器无需对增益进行调整便可获得最佳灵敏度和动态范围。为便于操作，GloMax® 系列发光检测仪随附了 Promega 公司产品的检测方案。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：800 810 8133(座机拨打)，400 810 8133(手机拨打)
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTB323
2021 制作

7. 相关产品

细胞凋亡产品

产品	规格	目录号
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	100 assays	JA1011
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	10ml	G6320
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	10ml	G6410
Caspase-Glo® 8 Assay	100ml	G8202
Caspase-Glo® 9 Assay	100ml	G8212
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	100ml	G7791
Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK	50µl	G7231
Caspase Inhibitor AC-DEVD-CHO	100µl	G5961
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	50µl	G7461
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	20 reactions	G7360
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	60 reactions	G3250
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant	300u	M1871

细胞活力检测

产品	规格	目录号
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	100 reactions	G9711
CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay	10ml	G9681
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	10ml	G9241
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9270
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9200
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10ml	G6080

细胞毒性检测产品	规格	目录号
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	J2380
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9260
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9290
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (measures release of LDH)	1,000–4,000 assays	G7891
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (measures release of LDH)	1,000 assays	G1780
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10ml	G8741

氧化应激检测

产品	规格	目录号
GSH-Glo™ Glutathione Assay	10ml	V6911
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10ml	V6611
ROS-Glo™ H2O2 Assay	10ml	G8820
Mitochondrial ToxGlo™ Assay	10ml	G8000

能量代谢检测

产品	规格	目录号
NAD/NADH-Glo™ Assay	10ml	G9071
NADP/NADPH-Glo™ Assay	10ml	G9081
Glucose Uptake-Glo™ Assay	5ml	J1341

发光检测仪

产品	规格	目录号
GloMax® Discover Microplate Reader	1 each	GM3000
GloMax® Explorer System (Fully Loaded)	1 each	GM3500
GloMax® Explorer System (Luminescence and Fluorescence)	1 each	GM3510
GloMax® Navigator System	1 each	GM2000
GloMax® Navigator System with Dual Injectors	1 each	GM2010

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：800 810 8133(座机拨打)，400 810 8133(手机拨打)
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTB323
2021 制作

8. 内容变更总结

对本文件 1/19 修订版的以下内容进行了变更：

1. 删除了铺板建议。

2. 增加新的相关产品。

3. 于 2021 年 7 月 19 日删除已停产产品。

[a]U.S. Pat. No. 6,602,677 and 7, 241,584 and 8,822,170, European Pat. No. 1131441, Japanese Pat. Nos. 4537573 and 4520084 and other patents pending.

[b]U.S. Pat. Nos. 7,148,030, 7,384,758 and 7,666,987,and 8,071,328, Japanese Pat. No. 4451663 and other patents pending.

© 2003–2015, 2018 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Anti-ACTIVE, Apo-ONE, Caspase-Glo, CellTiter 96, CellTiter-Fluor, CellTiter-Glo, CytoTox-Fluor, CytoTox 96 and GloMax are registered trademarks of Promega Corporation. CaspACE, CytoTox-ONE, DeadEnd, GSH-Glo, GSH/GSSG-Glo, Mitocondrial Tox-Glo, Ultra-Glo, RealTime-Glo, CellTox, Glucose Uptake-Glo, NAD/NADH-Glo, NADP/NADPH-Glo, ROS-Glo and CytoTox-Glo are trademarks of Promega Corporation.

Equator is a trademark of Allegro Technologies. GravityTRAP and GravityPLUS are trademarks of InSphero. Opti-MEM is a registered trademark of Invitrogen Corporation. Prionex is a registered trademark of Pentapharm Ltd.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.