



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
订货热线: 400-1683301或800-8283301  
订货e-mail: order@beyotime.com  
技术咨询: info@beyotime.com  
网址: http://www.beyotime.com

## Caspase 2活性检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1107	Caspase 2活性检测试剂盒	20次

### 产品简介:

- Caspase 2活性检测试剂盒(Caspase 2 Activity Assay Kit)是采用分光光度法检测细胞或组织裂解液中caspase 2酶活性或纯化的caspase 2酶活性的试剂盒。
- (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 2也称Ich-1或Nedd-2, 有时被写作caspase-2或caspase 2, 在细胞凋亡的信号转导过程中可以被激活。Caspase 2 mRNA可以被剪切成两种不同长短的形式。Caspase 2全长的mRNA产物可以促进凋亡, 而短的mRNA的蛋白产物则可以抑制细胞凋亡。在体外, caspase 2可以被caspase 1、caspase 3和granzyme B激活。
- 本Caspase 2活性检测试剂盒是基于caspase 2可以催化底物Ac-VDQGD-pNA (acetyl-Val-Asp-Gln-Gln-Asp *p*-nitroanilide)产生黄色的pNA (*p*-nitroaniline), 从而可以通过测定吸光度来检测caspase 2的活性。pNA在405nm附近有强吸收。
- 试剂盒中提供了caspase 2催化产生的黄色产物pNA, 可以作为定量caspase 2酶活性的标准品。
- 本试剂盒用酶标仪检测或容量不超过100 $\mu$ l的分光光度检测杯检测时, 除标准曲线外可以检测20个样品。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C1107-1	裂解液	8ml
C1107-2	检测缓冲液	8ml
C1107-3	Ac-VDQGD-pNA (2mM)	200 $\mu$ l
C1107-4	pNA (10mM)	200 $\mu$ l
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C保存, Ac-VDQGD-pNA和pNA需避光保存。

### 注意事项:

- 须自备可以测定A405或A400的酶标仪或容量不超过100 $\mu$ l的分光光度检测杯及相应分光光度计。优先考虑测定A405, 如有困难可以测定A400。
- Ac-VDQGD-pNA需尽量避免反复冻融, 请注意适当分装。
- 测定蛋白浓度需Bradford蛋白浓度测定试剂盒(P0006), 可向碧云天订购。建议样品用水稀释1倍后再用Bradford法测定蛋白浓度, 以降低DTT对蛋白浓度测定的干扰。
- pNA (中文名为4-硝基苯胺) 对人体有毒, 操作时请特别小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。pNA (10mM)在4°C、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或
- 管盖内, 可以20-25°C水浴温育片刻至全部融解后使用。
- 本试剂盒的裂解液可以和碧云天生产的其它caspase活性检测试剂盒的裂解液通用, 即本试剂盒裂解液制备的蛋白样品可以用于碧云天其它caspase活性检测试剂盒的检测。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明:

#### 1. 准备工作:

- 裂解液溶解后混匀并置于冰浴上备用。
- 检测缓冲液溶解后混匀并置于冰浴上备用。

#### 2. 测定pNA标准曲线:

- 标准品稀释液的配制: 按照每0.9ml检测缓冲液加入0.1ml裂解液的比例配制适量的标准品稀释液。
- 把试剂盒提供的pNA (10mM)用标准品稀释液稀释为0、10、20、50、100和200 $\mu$ M, 作为标准品。
- 每个浓度取100 $\mu$ l用酶标仪进行检测, 或取适当量用容量不超过100 $\mu$ l的分光光度检测杯进行检测, 测定A405。
- 每一个标准品的A405减去不含pNA的空白对照的A405计算出实际的因pNA而导致的吸光度, 并制作出pNA浓度相对于A405的标准曲线。pNA标准曲线可以参考图1, 在0-200 $\mu$ M范围内存在良好的线性关系。

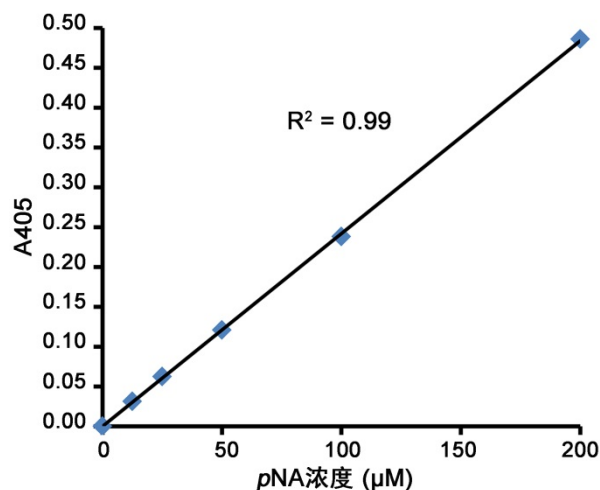


图1. *p*NA标准曲线。实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

### 3. 样品的收集:

- 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，600g 4°C离心5分钟收集细胞，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100微升裂解液的比例加入裂解液（如果裂解不充分，可以把裂解液的用量提高至150或200微升），重悬沉淀，冰浴裂解15分钟。下转步骤3d。
- 对于贴壁细胞:** 吸取细胞培养液，备用。用胰酶消化贴壁细胞，并收集至备用的细胞培养液中。600g 4°C离心5分钟收集细胞，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100微升裂解液的比例加入裂解液（如果裂解不充分，可以把裂解液的用量提高至150或200微升），重悬沉淀，冰浴裂解15分钟。下转步骤3d。
- 对于组织样品:** 按照每3-10mg组织加入100微升裂解液的比例加入裂解液，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。
- 4°C 16,000-20,000g离心10-15分钟。
- 把上清转移到冰浴预冷的离心管中。
- 立即测定caspase 2的酶活性或-70°C保存样品。同时可以取少量样品用Bradford法测定蛋白浓度，尽量使蛋白浓度达到1-3mg/ml，相当于每10微升待测样品中至少含有10-30μg蛋白。如果细胞较小，可以适当增加细胞的用量。

### 4. Caspase 2酶活性的检测:

- 取出适量的Ac-VDQD-*p*NA (2mM)，置于冰浴上备用。
- 如下设置反应体系:

	空白对照	样品
检测缓冲液	40μl	40μl
待测样品	0μl	50μl
裂解液	50μl	0μl
Ac-VDQD- <i>p</i> NA (2mM)	10μl	10μl
总体积	100μl	100μl

**注意:** 在设置反应体系时先加检测缓冲液，再加待测样品，适当混匀，注意避免在混匀时产生气泡。随后再加入10μl Ac-VDQD-*p*NA (2mM)。

- 加入Ac-VDQD-*p*NA (2mM)后混匀，注意避免在混匀时产生气泡。37°C孵育60-120分钟。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。
- 样品的A405扣除空白对照的A405，即为样品中caspase 2催化产生的*p*NA产生的吸光度。通过同步步骤1中获得的标准曲线的对比就可以计算出样品中催化产生了多少量的*p*NA。
- 参考Chemicon公司的caspase 2酶活力单位的定义：One unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0nmol of the colorimetric substrate Ac-VDQD-*p*NA per hour at 37°C under saturated substrate concentrations。即一个酶活力单位定义为当底物饱和时，在37°C一个小时内可以剪切1nmol Ac-VDQD-*p*NA产生1nmol *p*NA的caspase 2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 2。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°C孵育2个小时以内底物都是饱和的；对于样品中caspase 2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。
- 用Bradford法检测待测样品中的蛋白浓度(由于裂解液中含有较高浓度的DTT，不适合采用BCA法进行蛋白浓度测定)。这样就可以计算出一个样品单位重量蛋白中所含的caspase 2的酶活力单位。

### 常见问题:

#### 1. 测定出的A405过低:

- 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1-3mg/ml。
- 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，希望能找到一个caspase激活比较强的时间点，这样就可以检测出该caspase的激活。可以作一时间曲线，例如诱导凋亡0、2、4、8、16和24小时，或0、1、2、4、8和16小时，或0、1、2、4、6和8小时等。具体的诱导凋亡时间需根据具体情况而定。

## 2. 测定出的A405过高或者样品量不足：

测定出来的A405读数过高时，可以参考下表的反应体系适当减少样品的用量；样品量不足时也可以参考下表减少样品的用量。

	空白对照	样品
检测缓冲液	40μl	40μl
待测样品	0μl	xμl
裂解液	50μl	(50-x) μl
Ac-VDQQD-pNA (2mM)	10μl	10μl
总体积	100μl	100μl

说明：其中x不超过50，其余检测方法同上面的使用说明所述。

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C1101	Caspase 1 活性检测试剂盒	20次
C1102	Caspase 1 活性检测试剂盒	100次
C1107	Caspase 2 活性检测试剂盒	20次
C1108	Caspase 2 活性检测试剂盒	100次
C1115	Caspase 3 活性检测试剂盒	20次
C1116	Caspase 3 活性检测试剂盒	100次
C1121	Caspase 4 活性检测试剂盒	20次
C1122	Caspase 4 活性检测试剂盒	100次
C1135	Caspase 6 活性检测试剂盒	20次
C1136	Caspase 6 活性检测试剂盒	100次
C1151	Caspase 8 活性检测试剂盒	20次
C1152	Caspase 8 活性检测试剂盒	100次
C1157	Caspase 9 活性检测试剂盒	20次
C1158	Caspase 9 活性检测试剂盒	100次
P0006	Bradford蛋白浓度测定试剂盒	1000次

## 使用本产品的文献：

1. Qian YF, Yao WB, Wang H, Gao XD. The Mechanism of Kaixin San Inhibiting Apoptosis in Hydrogen Peroxide2induced PC12 Cells. Chin J Nat Med. 2007 Sep;5(5):379-84.
2. Liu Z, Zhao Y, Li J, Xu S, Liu C, Zhu Y, Liang S. The venom of the spider Macrothele raveni induces apoptosis in the myelogenous leukemia K562 cell line. Leuk Res. 2012 Aug;36(8):1063-6.
3. Xu S, Zhang F, Wang H, Liu Y, Li D, Wu Z, Liu Z. The Venom of the Centipede Scolopendra subspinipes mutilans Inhibits the Growth of Myelogenous Leukemia Cell Lines. Letters in Drug Design & Discovery. 2013 Jun;10(5):390-5.
4. Fang Q, Jiang S, Li C. Evodiamine Selectively Inhibits Multiple Myeloma Cell Growth by Triggering Activation of Intrinsic Apoptosis Pathway. ONCOTARGETS THER. 2019 Dec 24;12:11383-11391.

Version 2021.09.01