

Caspase-3 活性测定试剂盒说明书

(货号：ADS-W-D009 微板法 48 样)

一、产品简介：

Caspase-3 又称 CPP32、Yama 或 apopain，属于 CED-3 亚家族，是细胞凋亡过程中的一个关键酶。

利用 Caspase-3 分解底物 Ac-DEVD-pNA 产生黄色的对硝基苯胺 (pNA)，后者在 405nm 有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率即可得出 Caspase-3 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制：

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 | 备注 |
|------|--------------|---------|---|
| 提取液 | 液体 60mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 液体 10mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 液体 0.5mL×1 支 | -20°C保存 | 低温放置易冻住，放置室温使其解冻成液体再用，用不完的试剂分装后-20°C保存。 |
| 标准品 | 粉体 1 支 | 4°C保存 | 若重做标曲则用到该试剂。 |

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、天平、研钵、冰和蒸馏水。

四、Caspase-3 活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

② 细菌或培养细胞：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4°C×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照数量 (10⁴)：提取液体积(mL)为 500-1000：1 的比例进行提取

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 或于水浴锅 (25°C) 中孵育 10min，在 96 孔板中依次加入：

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|-----------|-----|
|-----------|-----|

一站式生命科学研究服务平台

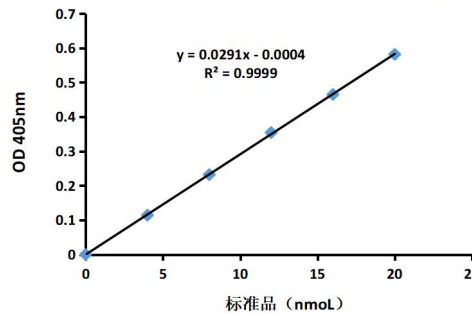
| | |
|--|-----|
| 样本 | 40 |
| 试剂一 | 150 |
| 试剂二 | 10 |
| 混匀, 于 405nm 处读取 A1 值, 37°C 反应 1h 后读取 A2 值。 $\Delta A = A2 - A1$ 。 | |

【注】：1. 加完试剂二即启动反应，所以试剂二加完混匀后**立即**检测，若 A2 值大于 1.5，可减少样本加样量 V1（如减至 10 μ L，则试剂一相应增加），或缩短反应时间 T（如由 1h 减至 30min），则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 小于 0.01，可延长反应时间 T（如由 1h 增至 2h 或更长），则改变后 T 需代入重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0291x - 0.0004$ ：x 为标准品（对硝基苯胺）(nmol)，y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时催化底物产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.0291] \div (W \times V1 \div V) \div T = 859.1 \times (\Delta A + 0.0004) \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每小时催化底物产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/mgprot)} = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.0291] \div (V1 \times Cpr) \div T = 859.1 \times (\Delta A + 0.0004) \div Cpr$$

4、按细胞数量计算：

单位定义：每 10⁴ 个细胞每小时催化底物产生 1nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.0291] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.72 \times (\Delta A + 0.0004)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

T---反应时间，1h；

W---样本质量，g；

500---细胞数量；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (50 μ mol/mL)：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入 0.5mL 乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.5mL 的蒸馏水混匀，得到 50 μ mol/mL 备用。
- 2 用蒸馏水把母液稀释成以下浓度：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μ mol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 40 μ L 标准品+160 μ L 试剂一，混匀后于 405nm 处读取 A 值，依据结果即可制作标准曲线。