

## Caspase-3 活性测定试剂盒说明书

(货号：ADS-W-D009 微板法 48 样 有效期：3 个月)

### 一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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	4°C 避光保存	1. 低温放置易冻住，放置室温解冻成液体再用； 2. 用不完的试剂分装后 -20°C 保存。 (保存周期与试剂盒有效期相同)。
标准品	粉体 1 支	4°C 避光保存	若重做标曲则用到该试剂。

### 三、实验器材：

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

##### 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 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

##### ③ 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 (10<sup>4</sup>)：提取液体积 (mL) 为 500-1000：1 的比例进行提取

#### 2、检测步骤：

##### ① 酶标仪预热 30min (等待仪器过自检程序亦可)，设定波长到 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：

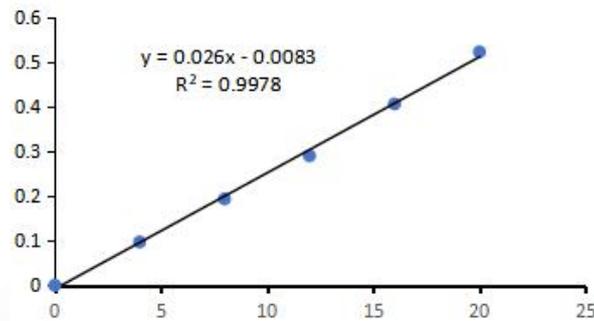
试剂组分 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	150
试剂二	10
混匀, 于 405nm 处读取 A1 值, 37°C 反应 1h 后读取 A2 值。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【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 10μL，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  $\Delta A$  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： $y = 0.026x - 0.0083$ ：x 为标准品（对硝基苯胺）(nmol)，y 为  $\Delta A$ 。



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)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0083) \div 0.026] \div (W \times V1 \div V) \div T = 961.54 \times (\Delta A + 0.0083) \div W$$

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)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/mgprot)} = [(\Delta A + 0.0083) \div 0.026] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 961.54 \times (\Delta A + 0.0083) \div \text{Cpr}$$

4、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每小时催化底物产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/ml)} = [(\Delta A + 0.0083) \div 0.026] \div V1 \div T = 961.54 \times (\Delta A + 0.0083)$$

5、按细胞数量计算：

单位定义：每  $10^4$  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)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0083) \div 0.026] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.92 \times (\Delta A + 0.0083)$$

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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（50 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ）：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 $\mu\text{mol}/\text{mL}$  标准品母液。
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100 $\mu\text{L}$ ，加入 900 $\mu\text{L}$ 蒸馏水，混匀得到 0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 $\mu\text{L}$	0	40	80	120	160	200
水 $\mu\text{L}$	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 ( $\mu\text{L}$ )	标准管	0 浓度管 (仅作一次)
标准品	40	
蒸馏水		40
试剂一	160	160
混匀，于 405nm 处读取 A 值， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度		