

Caspase-3 活性测定试剂盒说明书

(货号: G1215F 分光法 24 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 30mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂一 | 液体 20mL×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 mg×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、水浴锅、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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

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。

③ 液体样品: 液体样品: 澄清的液体可直接检测; 若浑浊则离心后取上清液检测。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂可于水浴锅 (25°C) 中孵育 10-20min,

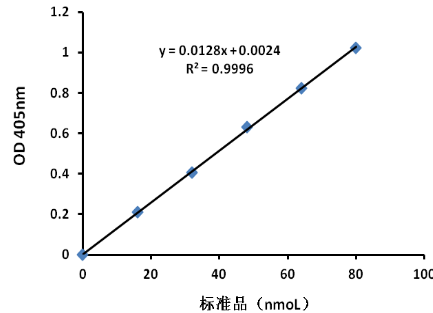
③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|-----------|-----|
| 样本 | 80 |
| 试剂一 | 600 |
| 试剂二 | 20 |

混匀，于 405nm 处读取 A1 值，37°C 反应 1h 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0.0128x + 0.0024：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)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0024) \div 0.0128] \div (W \times V1 \div V) \div T = 976.6 \times (\Delta A + 0.0024) \div W$$

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)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/mgprot)} = [(\Delta A + 0.0024) \div 0.0128] \div (V1 \times Cpr) \div T = 976.6 \times (\Delta A + 0.0024) \div Cpr$$

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)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0024) \div 0.0128] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.95 \times (\Delta A + 0.0024)$$

5、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)。

$$\text{Caspase-3 (nmol/h/mL 液体)} = [(\Delta A + 0.0024) \div 0.0128] \div V1 \div T = 976.6 \times (\Delta A + 0.0024)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.08mL；

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 (50μmol/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 50μmol/mL 备用。
- 2 用蒸馏水把母液稀释成以下浓度：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1μmol/mL。
- 3 80μL 标准品+620μL 试剂一，混匀后于 405nm 处读取 A 值，依据结果制作标准曲线。