

Caspase-3 活性测定试剂盒说明书

(货号: G1215W 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 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:

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:

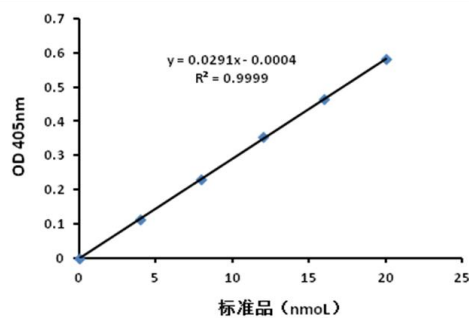
试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	150
试剂二	10
混匀, 于 405nm 处读取 A1 值, 37°C 反应 1h 后读取 A2 值。 ΔA=A2-A1。	

【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 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 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)。

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

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 (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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5μmol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 40μL 标准品+160μL 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。