

Caspase-3 活性测定试剂盒

(微板法 48 样)

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。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 0.5mL×1 支	-20℃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℃保存。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲则用到该试剂。

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。

C a s p a s e - 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：

称取约 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 (10^4)：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 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。 $\Delta A=A2-A1$ 。

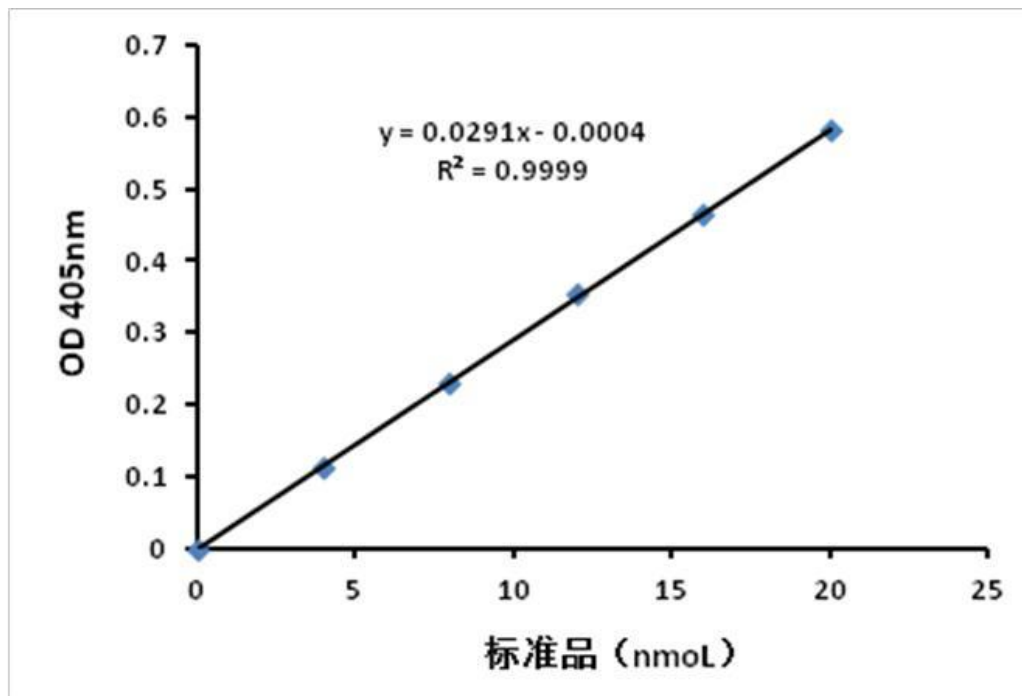
[注]：1. 加完试剂二即启动反应，所以试剂二加完混匀后立即检测，若 A2 值大于 1.5，

可减少样本加样量 V_1 (如减至 $10\mu\text{L}$, 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 V_1 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), 则改变后的 T 需代入公式重新计算。

结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0291x - 0.0004$: 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)。

$\text{Caspase-3}(\text{nmol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.0291] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 859.1 \times (\Delta A + 0.0004) \div W$ 。

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)。

Caspase-3 (nmol/h/mgprot)=[(ΔA+0.0004) ÷ 0.0291] ÷ (V1 × Cpr) ÷ T=859.1 × (ΔA+0.0004) ÷ Cpr。

4、按细菌或细胞密度计算：

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)。

Caspase-3 (nmol/h/10⁴ cell)=[(ΔA+0.0004) ÷ 0.0291] ÷ (500 × V1 ÷ V) ÷ T=1.72 × (ΔA+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 (10μmol/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 10μmol/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。