

# Caspase-3 活性测定试剂盒

## 分光法 24 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 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	若重新做标曲, 则用到该试剂

### 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、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:

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 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。

**[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 40μL，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。

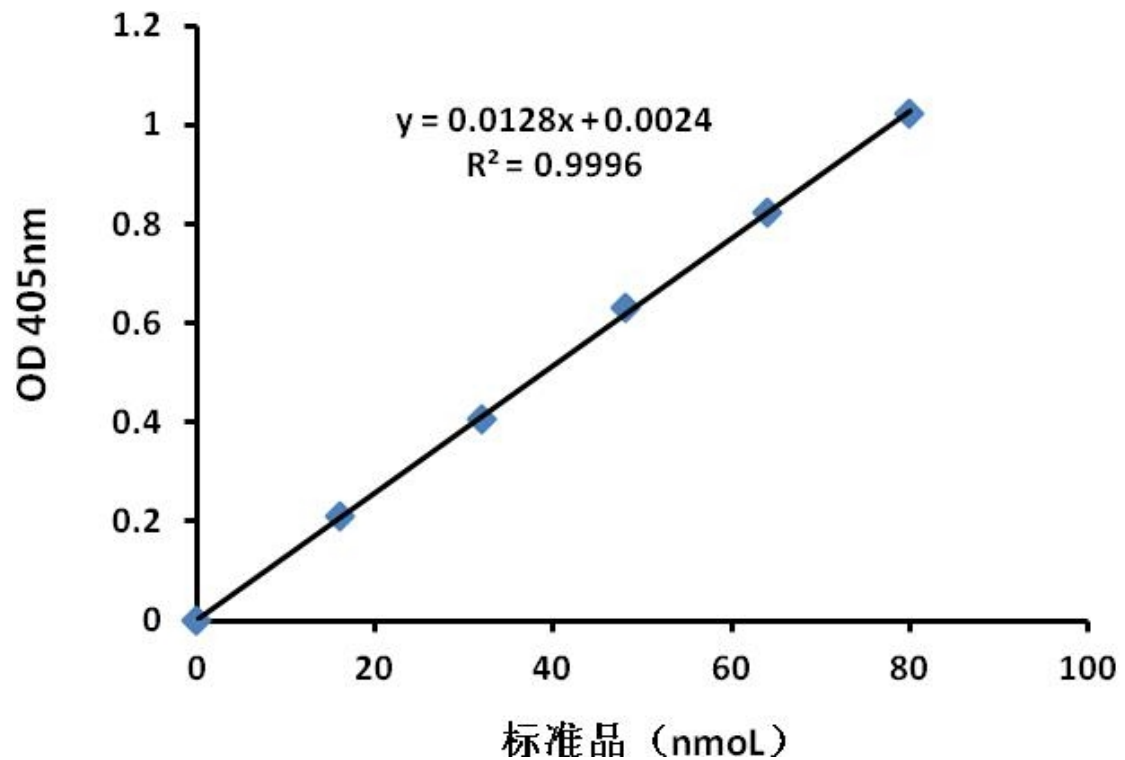
2. 若ΔA 小于 0.01，可延长反应时间 T（如由 1h 增至 2h 或更长），则改变后的 T 需

代入公式重新计算。

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 $\Delta A$ 。



### 2、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)。

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

#### 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)。

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

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 ( $10\mu\text{mol/mL}$ )：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  $10\mu\text{mol/mL}$  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,  $1\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际来调整浓度。
3.  $80\mu\text{L}$  标准品 +  $620\mu\text{L}$  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。