

Caspase-3 活性测定试剂盒说明书

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

② 所有试剂解冻至室温（25°C）或于水浴锅（25°C）中孵育 10min，再在 1mL 玻璃

比色皿（光径 1cm）中依次加入：

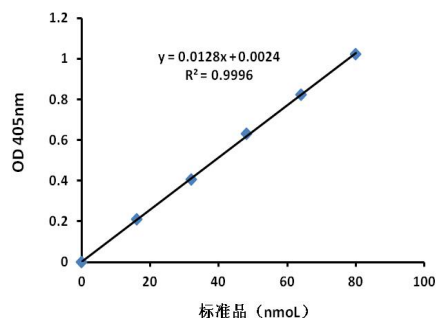
试剂名称（ μL ）	测定管
样本	80
试剂一	600
试剂二	20
混匀，于 405nm 处读取 A1 值，37°C 反应 1h 后读取 A2 值。 $\Delta A=A2-A1$ 。	

【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 40 μL ，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。

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/L)，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 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 μL 标准品+620 μL 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。