

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。

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 (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。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

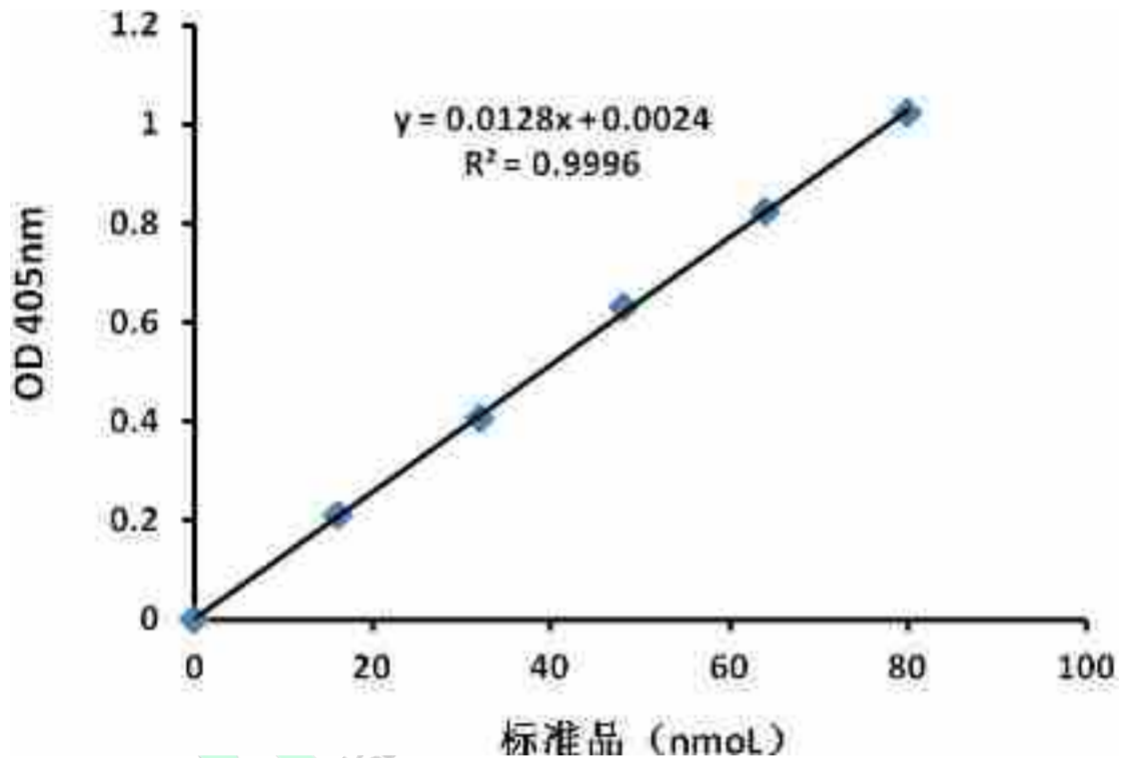
[注]: 1. 加完试剂二即启动反应, 所以试剂二加完混匀后立即检测, 若 A2 值大于 1.5, 可减少样本加样量 V1 (如减至 40 μL , 则试剂一相应增加), 或缩短反应时间 T (如由 1h 减至 30min), 则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

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。

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 。肌酐含量(nmol/g)=(C



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)。

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)。

Caspase-3 (nmol/h/mgprot)=[(ΔA+0.0024) ÷ 0.0128] ÷ (V1 × Cpr) ÷ T=976.6 × (ΔA+0.0024) ÷ 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)。

Caspase-3 (nmol/h/10⁴cell)=[(ΔA+0.0024) ÷ 0.0128] ÷ (500 × V1 ÷ V) ÷ T=1.95 × (ΔA+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 (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, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1μmol/mL。也可根据实际来调整浓度。
3. 80μL 标准品+620μL 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。