

Caspase-9 活性检测试剂盒

中文名称: **Caspase-9 活性检测试剂盒**

英文名称 : Caspase-9Activity Assay Kit

储存条件 : -20℃

产品包装 : 盒装

检测方法 : 比色法

有效期 : 6 个月

产品规格 : 20T 、 50T 、 100T

产品组成:

试剂名称/规格	20T	50T	100T	保存条件
试剂一	液体 20mL×1 瓶	液体 20mL×1 瓶	液体 25mL×1 瓶	-20℃保存
试剂二	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	液体 120mL×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 0.25L×1 支	液体 0.55mL×1 支	液体 0.55mL×2 支	-20℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	液体 1mL×1 支	液体 1mL×1 支	-20℃保存

溶液的配制:

- 1、 试剂一: 分装-20℃保存。
- 2、 试剂二: 分装-20℃保存。
- 3、 标准液: pNA 标准溶液, 5mmol/L。标准溶液在 4℃条件下为浑浊状态, 溶解即可变为澄清状态, 不影响使用。
- 4、 标准品稀释液配制: 取 9mL 试剂一加入 1mL 试剂二, 充分混匀待用。(也可按照试剂一: 试剂二=9:1 的比例, 自行配制)。

产品说明:

Caspase 是参与细胞凋亡过程的蛋白酶家族,包含 10 多个成员。Caspase-9 也称 ICE-LAP6 或 Mch6, 可与细胞色素 c 和 Apaf1 形成复合物被激活, 并进一步激活细胞凋亡的关键酶 caspase-3, 从而触发凋亡级联反应。Caspase-9 是凋亡信号转导过程中重要的上游 caspase, 其激活可以通过磷酸化进行调控。

本试剂盒测定原理基于 Caspase-9 特异水解多肽底物 LEHD-pNA(Leu-Glu-His-Asp-p-nitroanilide), 释放的游离硝基苯胺 pNA 在 405nm 有大吸收峰。采用可见光光度比色法测定 pNA 而得到 Caspase 活性。适用于检测哺乳动物组织、细胞 Caspase-9 活性。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、100 μ L 玻璃比色皿/96 孔板、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

一、样本处理 (可适当调整待测样本量)

1、培养细胞: 先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细胞数量 (约 10^6 个) 加 100 μ L 试剂二 (若裂解不充分可提高至 150-200 μ L), 震荡重悬沉淀, 置冰上静置 15min, 4 $^{\circ}$ C, 15000g 离心 10-15min, 取上清置冰上待测。

2、组织: 按照组织质量 (g): 试剂二体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂二), 冰浴研磨或充分剪碎, 置冰上静置 15min, 4 $^{\circ}$ C, 15000g 离心 10-15min, 取上清置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。
- 2、临用前用标准品稀释液将 5mmol/LpNA 标准品稀释至 200、100、50、25、12.5、0 $\mu\text{mol/L}$ 的标准溶液待用。
- 3、样本测定（在 96 孔板/EP 管中按顺序加入以下试剂）

试剂名称(μL)	测定管	空白管	标准管
试剂一	40	40	
样本	50		
试剂二		50	
试剂三	10	10	
标准溶液			100
混匀，盖紧 96 孔板盖子并用封口膜密封。37°C 孵育 60-120 分钟。发现颜色变化比较明显时即可测定 405nm 处吸光值。如果颜色变化不明显，可以适当延长孵育时间，甚至可以孵育过夜。空白管只需做 1-2 次。计算 ΔA 测定 = A 测定管 - A 空白管。			立即测定 405nm 下吸光度

三、Caspase-9 活性计算

1. 标准曲线的建立：

根据标准管的浓度 (x , $\mu\text{mol/L}$) 和吸光度 (y , 减去浓度为 0 的空白管) 做标准方程。将 ΔA 测定代入标准方程得到 $x(\mu\text{mol/L})$ 。

2. 按酶活性增加百分比计算

Caspase-9 活性增加百分比 = (实验处理组 A 测定 - A 空白管) / (实验对照组 A 测定 - A 空白管) $\times 100\%$ 该方法简单可靠，可粗略反应酶活性情况。

3. 按酶活计算

参考 Chemicon 公司的 caspase 酶活力单位的定义：One unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0 nmol of the colorimetric pNA-substrate per hour at 37°C

under saturated substrate concentrations。即一个酶活力单位定义为当底物饱和时，在 37°C 一个小时内可以剪切 1nmol pNA 底物产生 1nmol 游离 pNA 的酶量。这样就可以计算出样品中含有多少个酶活力单位的 caspase 酶活性。

Caspase-9 活性 (U/mg prot) = $x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10^3 = 2x \div C_{\text{pr}} \div T$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.1mL = 10^{-4} L; $V_{\text{样}}$: 加入的样本体积, 0.05mL; T : 反应时间, h; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; 10^3 : 单位换算系数, 1 μ mol = 10^3 nmol。

注意事项:

- 1、由于试剂二中含有还原剂 (DTT)，建议将样品用水稀释 2 倍后，用 Bradford 法测定蛋白浓度，以降低 DTT 对蛋白浓度测定的干扰。不建议使用 BCA 法测定蛋白浓度。
- 2、Caspase 活性测定值低常见的原因是细胞未发生凋亡或细胞量太少，其次是观测时间不恰当。诱导凋亡时，并非剂量越大时间越长 Caspase 活性就越高。建议设置不同剂量和时间点如 0、2、4、8、16、24 小时，以检测佳的观察点。
- 3、所测样本的值高于标准曲线上限时，可用试剂二稀释样本后重新测定。
- 4、盖紧 96 孔板盖子并用封口膜密封。37°C 孵育，肉眼可见颜色变黄时的 OD405 值约为 0.2，此时即可测定。颜色变化不明显可延长反应或过夜，但酶活性较强时，孵育时间过长将导致反应失去线性关系。