

## Caspase 9活性检测试剂盒(分光光度法)

货号：P-CA-086

### 产品简介

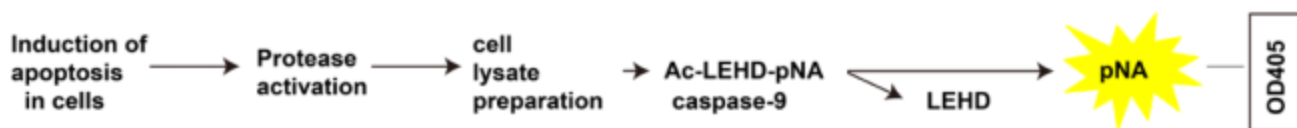
Caspase 9活性检测试剂盒(分光光度法)采用分光光度法,可用于检测细胞、组织裂解液或其它样本的caspase 9活性。

### 背景介绍

Caspase 9又称ICE-LAP6 或Mch6,是细胞凋亡信号转导过程中比较上游的一个caspase。线粒体释放细胞色素c以后,Caspase 9可以和细胞色素c以及Apaf1形成复合物,同时被激活。激活的caspase 9可以激活细胞凋亡的最关键酶caspase 3,从而促进后续的细胞凋亡信号。Caspase 9的激活可以通过磷酸化进行调控。

### 检测原理

本caspase 9活性检测试剂盒是基于caspase 9可以催化底物Ac-LEHD-pNA产生黄色的pNA(p-nitroaniline),pNA在405nm附近有强吸收,从而可以通过测定吸光度来检测caspase 9的活性。



### 检测样本类型

细胞样本 组织样本

### 产品组分

产品名称	20 Assays	50 Assays	100 Assays	Storage
Cell Lysis Buffer	10 mL	25 mL	50 mL	-5~-20°C
2×Reaction Buffer	10 mL	25 mL	50 mL	-5~-20°C
Ac-LEHD-pNA(4 mM)	100 μL	250 μL	500 μL	-5~-20°C;避光
pNA (10 mM)	200 μL	500 μL	1 mL	-5~-20°C;避光
说明书	一份			

### 保存条件

-5~-20°C可保存12个月。Ac-LEHD-pNA (4 mM)应适当分装并避光保存,避免反复冻融。

### 自备试剂及仪器

网站: [www.procell.com.cn](http://www.procell.com.cn)

电话: 400-999-2100; 027-87287608

邮箱: [sales@procell.com.cn](mailto:sales@procell.com.cn)

地址: 湖北省武汉市高新大道858号生物医药产业园三期C4栋



## 1) 试剂

PBS、蛋白定量试剂盒（Bradford法）。

## 2) 仪器

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、恒温培养箱、移液器、研钵或匀浆器。

## 注意事项

1. 所有待检样本都需检测蛋白浓度，由于样本裂解液中含有还原剂，不适合使用BCA法进行蛋白浓度测定，推荐使用考马斯亮蓝法（Bradford法）。
2. 建议在正式实验前，选择 2~3 个预期差异大的样本进行预实验，若样本吸光值超过标准曲线的测量范围，则需稀释样本或者调整上样量再进行测定。
3. 进行caspase 9活性测定的样本，其蛋白浓度应在1~4mg/mL，否则会影响实验结果的准确性。
4. 一次实验的细胞数目建议不低于 $1 \times 10^6$ 个，组织样本不低于50mg，以便达到1~4mg/mL的蛋白浓度。否则会影响实验的精准度，导致蛋白浓度过低，反应体系内活性caspase 9过少而OD值偏低。

## 准备工作

1. Cell Lysis Buffer溶解后混匀，冰浴备用。
2. 2×Reaction Buffer溶解后混匀，冰浴备用。
3. Ac-LEHD-pNA和pNA溶解后混匀，冰浴备用。

## 样本准备

### 1) 细胞样本

按照常规方法收集细胞沉淀，PBS重悬细胞并计数， $600 \times g$ 离心5 min，弃上清，按照每100万细胞加入100  $\mu$ L Cell Lysis Buffer的比例加入预冷的Cell Lysis Buffer重悬细胞，在冰浴条件下裂解30 min，裂解期间需涡旋震荡3~4次，每次10 s。裂解后的样本，于4°C， $11000 \times g$ 离心10~15 min，小心地吸取上清至新的EP管中，并置于冰上待用。同时使用Bradford法测定蛋白浓度。

**注：检测贴壁细胞时，需收集诱导后产生的悬浮细胞，并与后续收集的贴壁细胞一起检测。**

### 2) 组织样本

取50 mg待测组织样本，用PBS或者生理盐水清洗1-2次，去除组织中残留的血细胞，用手术剪剪碎，加入200  $\mu$ L预冷的Cell Lysis Buffer，进行匀浆（在冰浴条件下进行，若组织质量加倍时，加入的预冷Cell Lysis Buffer也需加倍）。将匀浆好的样本转移至1.5 mL离心管中，冰浴裂解30 min。裂解后的样本，于4°C， $11000 \times g$ 离心10~15 min，小心地吸取上清至新的EP管中，并置于冰上待用。同时使用Bradford法测定蛋白浓度。

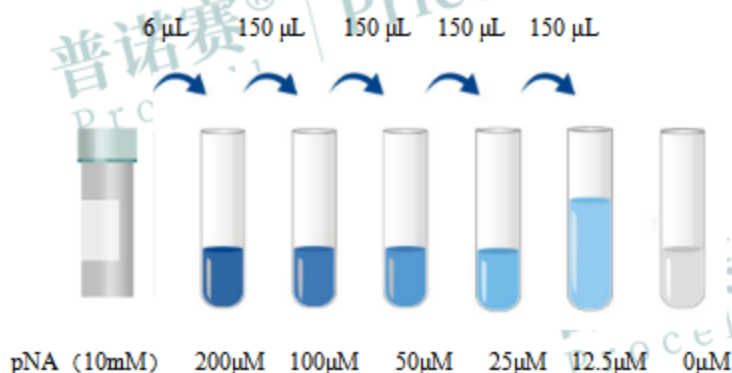
**注：制备好的样本应立即测定，若无法及时测定，可将裂解后的上清保存在-80°C，2周内进行检测。**



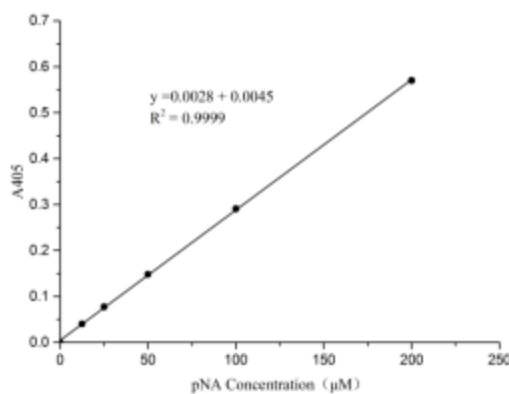
## 实验步骤

### 1. 制备pNA标准曲线（选做）

- 1) 配制标准品稀释液：取冰浴的Cell Lysis Buffer和2×Reaction Buffer，按照1:1配制标准品稀释液，涡旋或吹打混匀。
- 2) 进行倍比稀释：取6支EP管，第一支EP管中加入294 μL标准品稀释液，其他每管中加入150 μL标准品稀释液，从pNA (10 mM)的标准品中吸取6 μL到第一支EP管中混匀配成200 μM的标准品工作液，吸取150 μL到第2支EP管，混匀后吸取150 μL到第3支EP管，按此步骤往后依次吸取混匀至第5支EP管，如下图所示：



- 3) 每管取100 μL不同浓度的标准品置于酶标板或比色皿中，检测405 nm下OD值。（为保证实验结果的准确性，建议所有的待测样本和标准品都设立复孔。）
- 4) 绘制标准曲线：分别以标准品浓度和对应绝对OD值（每一个标准品的OD<sub>405</sub>减去不含pNA的OD<sub>405</sub>）作为x轴和y轴，使用图形软件（或 EXCEL）绘制标准曲线，如下图所示。实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。



## 2. Caspase 9的活性检测

1) 取50 μL样本裂解液, 按照下表设置反应体系。

	空白孔	样本孔
Cell Lysis Buffer	50 μL	0 μL
2×Reaction Buffer	45 μL	45 μL
待测样品	0 μL	50 μL
Ac-LEHD-pNA	5 μL	5 μL
总体积	100 μL	100 μL

注意: 在设置反应体系时, 先加入反应液, 再加入待测样本后适当混匀, 最后加入Ac-LEHD-pNA并混匀, 所有加液步骤注意避免气泡产生。

2) 加入Ac-LEHD-pNA后混匀, 37°C孵育1~2 h, 发现颜色变化较明显时即可检测OD405。若颜色变化不明显, 可适当延长孵育时间到4 h。

### 结果计算

#### 方法一: 按照酶活性增加的百分比计算

$$\text{Caspase 9活性百分比} = \frac{\text{OD}_{\text{样本}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}}{\text{Cpr}_{\text{样本}}} \div \frac{\text{OD}_{\text{阳性}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}}{\text{Cpr}_{\text{阳性}}} \times 100\%$$

注: 阴性对照为不做凋亡处理的生物学对照组。

#### 方法二: 按照酶活计算

1. 建立标准曲线: 根据标准管的浓度 (x, μmol/L) 和吸光度 (y, 减去浓度为 0 的空白管) 做标准方程  $y=ax+b$ 。

2. 计算caspase 9酶活力:

Caspase 9酶活力单位的定义: One unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0 nmol of the colorimetric substrate Ac-LEHD-pNA 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1 nmol Ac-LEHD-pNA产生1 nmol游离的 pNA的caspase 9的酶量。

$$\text{Caspase 9 activity (U/mgprot)} = \frac{\Delta A - b}{a} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} \times f$$

注:

y: 标准品测定OD值-空白OD值;

x: 标准品的浓度;

a: 标曲的斜率,

b: 标曲的截距;

ΔA: 测定孔OD值-空白孔OD值;

V反应: 反应体系总体积, 0.1 mL

V样: 加入的样本体积, 0.05 mL;

T: 反应时间, h

Cpr: 样本加入检测体系前的蛋白质浓度, mgprot/mL    f: 样本加入检测体系前的稀释倍数



## 常见问题及解决方案

现象	可能原因	建议
OD405值偏低或无信号	焦亡现象不明显或者细胞处于焦亡晚期，细胞破碎死亡。	焦亡现象不明显以及诱导过度至细胞死亡均无法有效检测到 caspase 9 的活化，可设置梯度诱导浓度和诱导时间选择最佳的诱导方案。
	细胞诱导时的密度太大。	降低诱导时细胞的密度，摸索最佳诱导密度，推荐诱导浓度为 $5 \sim 10 \times 10^5$ /mL。
	细胞数目太少，Cell Lysis Buffer太多。	增加细胞的数量，每100万细胞加入50~100 $\mu$ L Cell Lysis Buffer。
	检测总蛋白量较低。	使用Bradford法测浓度，提高蛋白检测的总量，可以进行预实验检测，检测总蛋白不低于50 $\mu$ g。
	温度较高，Cell Lysis Buffer中的DTT失活，Caspase酶失活。	Cell Lysis Buffer和细胞裂解过程在冰上进行，每10分钟进行涡旋混匀一次，充分保证酶活。
	细胞沉淀的保存条件不佳，导致细胞降解，Caspase酶失活。	收集细胞沉淀后立即放入-20 $^{\circ}$ C（1个月）或者-80 $^{\circ}$ C（2个月）保存备用，规定时间内进行检测。
	波长范围选择错误。	最佳检测波长为405nm，若仪器不符合，可选择405 $\pm$ 20 nm范围。
	37 $^{\circ}$ C孵育时间过长。	适当延长37 $^{\circ}$ C孵育时间，建议最佳孵育时间为1~2小时内，随着时间延长，control组的背景数值会逐渐增大，导致结果偏低。
OD405值偏高	细胞处理试剂或者药物有颜色，且在405 nm波长有吸收峰。	增加细胞离心洗涤的次数，设置细胞处理试剂的空白对照，最终实验结果减去药物试剂的影响。
	检测样本中有较多气泡。	排除气泡后再检测。
	使用回收的96孔板中有杂质附着，导致结果偏高。	建议使用新的一次性96孔板。

## 声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. pNA(4-硝基苯胺)对人体有毒，操作时请特别小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。pNA 在较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可以 20~25 $^{\circ}$ C水浴温育片刻至全部融解后使用。
4. 样品中激活的caspase水平较低时，首先确认焦亡或者凋亡现象是否明显。如果细胞焦亡或者凋亡比较明显且确认该caspase是可以被激活的，可适当调节诱导细胞的时间，找到一个caspase激活比较强的时间点，以便检测出该caspase的激活。可作时间曲线，例如诱导0、2、4、8、16和24小时，或 0、1、2、4、8和16小时，或0、1、2、4、6和8小时等。具体的诱导凋亡时间需根据具体情况而定。
5. 在本试剂盒的反应体系中，底物的起始浓度为0.2 mM，对于绝大多数样品来说，在37 $^{\circ}$ C孵育2个小时以内底物都是饱和的，针对少数样品中caspase 9酶活力特别高的情况，须用Cell Lysis Buffer适当稀释样品后再进行测定。

