

Elabscience® Caspase 9 Activity Assay Kit (Colorimetric Method)

货号: E-CK-A389

规格: 20 Assays/50 Assays/100 Assays

产品组分

产品编号	产品名称	20 Assays	50 Assays	100 Assays	Storage
E-CK-A38A	Cell Lysis Buffer	10 mL	25 mL	50 mL	-20 °C
E-CK-A38B	2×Reaction Buffer	10 mL	25 mL	50 mL	-20 °C
E-CK-A389C	Ac-LEHD-pNA (4 mM)	100 μL	250 μL	500 μL	-20 °C, shading light
E-CK-A38D	pNA (10 mM)	200 μL	500 μL	1 mL	-20 °C, shading light
说明书	一份				

产品简介

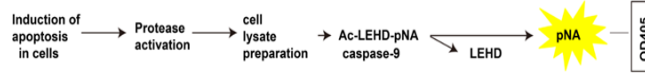
Elabscience®自主研发的 Caspase 9 Activity Assay Kit 采用分光光度法, 可用于检测细胞、组织裂解液或其它样品的 caspase 9 活性。

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

保存条件

-20 °C 可保存一年。Ac-LEHD-pNA (4 mM) 应当适当分装并避免光保存, 避免反复冻融。

自备试剂及仪器

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 1~4 mg/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 1×10^6 个, 组织样本不低于 50mg, 以便达到 1~4 mg/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 μL 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 (E-BC-K168-M) 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

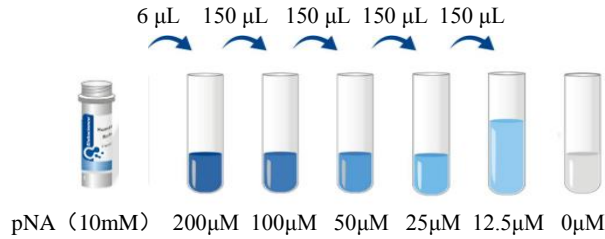
取 50 mg 待测组织样本, 用 PBS 或者生理盐水清洗 1-2 次, 去除组织中残留的血细胞, 用手术剪剪碎, 加入 200 μL 预冷的 Cell Lysis Buffer, 进行匀浆 (在冰浴条件下进行, 若组织质量加倍时, 加入的预冷 Cell Lysis Buffer 也需加倍)。将匀浆好的样本转移至 1.5 mL 离心管中, 冰浴裂解 30 min。裂解后的样本, 于 4 °C, $11000 \times g$ 离心 10~15 min, 小心地吸取上清至新的 EP 管中, 并置于冰上待用。同时使用 Bradford 法 (E-BC-K168-M) 测定蛋白浓度。

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。

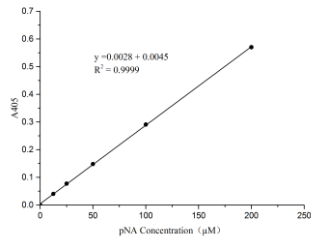
实验步骤

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, 按此步骤往后续依次吸取混匀至第 5 支 EP 管, 如下图所示:



- 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。)
- 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 OD₄₀₅ 减去不含 pNA 的 OD₄₀₅) 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

- 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。

- 加入 Ac-LEHD-pNA 后混匀, 37℃ 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

- 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 $y=ax+b$ 。
- 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℃ under saturated substrate concentrations。即一个酶活力单位定义为当底物饱和时, 在 37℃ 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
OD ₄₀₅ 值偏低或无信号	药物不激活 caspase 9。	并非所有的细胞凋亡都可以检测到 caspase 9, 可设置药物处理的时间梯度, 或者根据常见的阳性对照模型设置对照检测。
	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, 推荐诱导浓度密为 5~10×10 ⁵ /mL。

OD ₄₀₅ 值偏低或无信号	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 μL 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 50ug。
	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℃ (1 个月) 或者 -80℃ (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±20 nm 范围。
OD ₄₀₅ 值偏高	37℃ 孵育时间过长。	适当延长 37℃ 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。
	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

- 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
- 请注意安全事项, 遵守实验室试剂操作规范操作。
- 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℃ 水浴温育片刻至全部融解后使用。
- 样品中激活的 caspase 水平较低时, 首先确认凋亡现象是否明显。如果细胞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。具体的诱导时间需根据具体情况而定。
- 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℃ 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检测。