

Elabscience® Caspase 9 Activity Assay Kit
(Colorimetric Method)

货号：GCQ0074

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

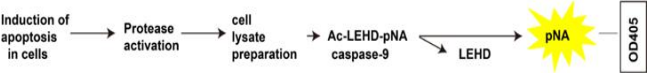
Elabscience®自主研发的 Caspase 9 Activity Assay Kit 采用分光光度法，可用于检测细胞、组织裂解液或其它样品的 caspase 9 活性。

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

- 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）。
- 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。
- 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。
- 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

- Cell Lysis Buffer 溶解后混匀，冰浴备用。
- 2×Reaction Buffer 溶解后混匀，冰浴备用。
- 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

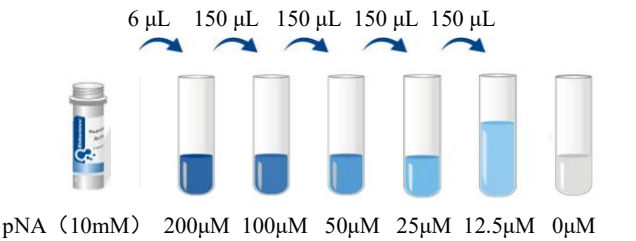
取 50 mg 待测组织样本，用 PBS 或者生理盐水清洗 1-2 次，去除组织中残留的血细胞，用手术剪剪碎，加入 200 μL 预冷的 Cell Lysis Buffer，进行匀浆（在冰浴条件下进行，若组织质量加倍时，加入的预冷 Cell Lysis Buffer 也需加倍）。将匀浆好的样本转移至 1.5 mL 离心管中，冰浴裂解 30 min。裂解后的样本，于 4°C， $11000 \times g$ 离心 10~15 min，小心地吸取上清至新的 EP 管中，并置于冰上待用。同时使用 Bradford 法（E-BC-K168-M）测定蛋白浓度。

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。

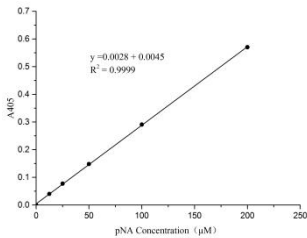
实验步骤

1. 制备 pNA 标准曲线（选做）

- 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。
- 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 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

- 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℃ 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

Caspase 9 活性百分比 = $\frac{OD_{\text{样本}} - OD_{\text{空白对照}}}{Cpr_{\text{样本}}} \div \frac{OD_{\text{阴性}} - OD_{\text{空白对照}}}{Cpr_{\text{阴性}}} \times 100\%$

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℃ 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。

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

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

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℃ 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。
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℃ 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。