

M5 Caspase 9 活性检测试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Caspase 9 活性检测试剂盒	20T	MF479-01

【储存条件】

-20°C 保存，Ac-LEHD-pNA 和 pNA 需避光保存。

【产品简介】

Caspase 9 活性检测试剂盒(Caspase 9 Activity Assay Kit)是采用分光光度法检测细胞或组织裂解液中 caspase 9 酶活性或纯化的 caspase 9 酶活性的试剂盒。Caspase(Cysteine-requiring Aspartate Protease)是一个在细胞凋亡过程中起重要作用的蛋白酶家族。Caspase 9 也称 ICE-LAP6 或 Mch6, 有时被写作 caspase-9 或 caspase 9, 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。

本 Caspase 9 活性检测试剂盒是基于 caspase 9 可以催化底物 Ac-LEHD-pNA(acetyl-Leu-Glu-His-Asp p-nitroanilide)产生黄色的 pNA(p-nitroaniline), 从而可以通过测定吸光度来检测 caspase 9 的活性。pNA 在 405nm 附近有强吸收。试剂盒中提供了 caspase 9 催化产生的黄色产物 pNA, 可以作为定量 caspase 9 酶活性的标准品。本试剂盒用酶标仪检测或容量不超过 100 μ l 的分光光度检测杯检测时, 除标准曲线外可以检测 20 个样品。

【产品组份】

裂解液	8ml
检测缓冲液	8ml
Ac-LEHD-pNA (2mM)	200 μ l
pNA (10mM)	200 μ l



【实验前准备及重要注意事项】

1. 须自备可以测定 A405 或 A400 的酶标仪或容量不超过 100 μ l 的分光光度检测杯及相应分光光度计。优先考虑测定 A405, 如有困难可以测定 A400。
2. Ac-LEHD-pNA 需尽量避免反复冻融, 请注意适当分装。
3. 测定蛋白浓度需 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(MF071)。建议样品用水稀释 1 倍后再用 Bradford 法测定蛋白浓度, 以降低 DTT 对蛋白浓度测定的干扰。
4. pNA(中文名为 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(10mM)在 4°C、冰浴等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°C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
5. 本试剂盒的裂解液可以和聚合美生产的其它 caspase 活性检测试剂盒的裂解液通用, 即本试剂盒裂解液制备的蛋白样品可以用于聚合美其它 caspase 活性检测试剂盒的检测。
6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

【操作步骤】**1. 准备工作：**

- a. 裂解液溶解后混匀并置于冰浴上备用。
- b. 检测缓冲液溶解后混匀并置于冰浴上备用。

2. 测定 pNA 标准曲线：

- a. 标准品稀释液的配制：按照每 0.9ml 检测缓冲液加入 0.1ml 裂解液的比例配制适量的标准品稀释液。
- b. 把试剂盒提供的 pNA (10mM)用标准品稀释液稀释为 0、10、20、50、100 和 200 μ M，作为标准品。
- c. 每个浓度取 100 μ l 用酶标仪进行检测，或取适当量用容量不超过 100 μ l 的分光光度检测杯进行检测，测定 A405。
- d. 每一个标准品的 A405 减去不含 pNA 的空白对照的 A405 计算出实际的因 pNA 而导致的吸光度，并制作出 pNA 浓度相对于 A405 的标准曲线。pNA 标准曲线可以参考图 1，在 0-200 μ M 范围内存在良好的线性关系。

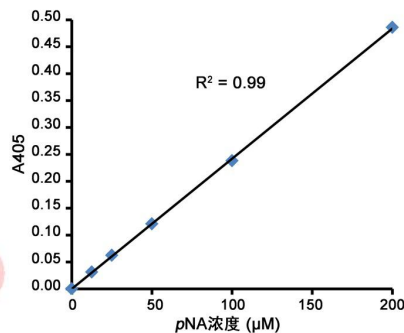


图 1.pNA 标准曲线。实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

3. 样品的收集：

- a. 对于悬浮细胞：把没有诱导凋亡的对照样品和诱导凋亡的样品，600g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟收集细胞，小心吸除上清，同时确保尽量没有细胞被吸除，PBS 洗涤一次。同前吸尽上清后，按照每 200 万细胞加入 100 微升裂解液的比例加入裂解液，重悬沉淀，冰浴裂解 15 分钟。下转步骤 3d。
- b. 对于贴壁细胞：吸取细胞培养液，备用。用胰酶消化贴壁细胞，并收集至备用的细胞培养液中。600g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟收集细胞，小心吸除上清，同时确保尽量没有细胞被吸除，PBS 洗涤一次。同前吸尽上清后，按照每 200 万细胞加入 100 微升裂解液的比例加入裂解液，重悬沉淀，冰浴裂解 15 分钟。下转步骤 3d。
- c. 对于组织样品：按照每 3-10mg 组织加入 100 微升裂解液的比例加入裂解液，在冰浴上用玻璃匀浆器匀浆。然后把匀浆液转移到 1.5ml 离心管中，冰浴再裂解 5 分钟。
- d. 4 $^{\circ}$ C 16,000-20,000g 离心 10-15 分钟。
- e. 把上清转移到冰浴预冷的离心管中。
- f. 立即测定 caspase 9 的酶活性或-70 $^{\circ}$ C 保存样品。同时可以取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度，尽量使蛋白浓度达到 1-3mg/ml，相当于每 10 微升待测样品中至少含有 10-30 μ g 蛋白。如果细胞较小，可以适当增加细胞的用量。

4. Caspase 9 酶活性的检测：

- a. 取出适量的 Ac-LEHD-pNA (2mM), 置于冰浴上备用。
- b. 如下设置反应体系:

	空白对照	样品
检测缓冲液	40 μ l	40 μ l
待测样品	0 μ l	50 μ l
裂解液	50 μ l	0 μ l
Ac-LEHD-pNA (2mM)	10 μ l	10 μ l
总体积	100 μ l	100 μ l

注意: 在设置反应体系时先加检测缓冲液, 再加待测样品, 适当混匀, 注意避免在混匀时产生气泡。随后再加入 10 μ l Ac-LEHD-pNA (2mM)。

- c. 加入 Ac-LEHD-pNA (2mM)后混匀, 注意避免在混匀时产生气泡。37 $^{\circ}$ C 孵育 60-120 分钟。发现颜色变化比较明显时即可测定 A_{405} 。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。
- d. 样品的 A_{405} 扣除空白对照的 A_{405} , 即为样品中 caspase 9 催化产生的 pNA 产生的吸光度。通过同步骤 1 中获得的标准曲线的对比就可以计算出样品中催化产生了多少量的 pNA。
- e. 参考 Chemicon 公司的 caspase 9 酶活力单位的定义: One unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0nmol of the colorimetric substrate Ac-LEHD-pNA per hour at 37 $^{\circ}$ C under saturated substrate concentrations。即一个酶活力单位定义为当底物饱和时, 在 37 $^{\circ}$ C 一个小时内可以剪切 1nmol Ac-LEHD-pNA 产生 1nmol pNA 的 caspase 9 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 9。说明: 在本试剂盒的检测体系中, 底物的起始浓度为 0.2mM, 此时底物是饱和的, 对于许多样品而言在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 个小时以内底物都是饱和的; 对于样品中 caspase 9 酶活力特别高的情况, 须用裂解液适当稀释样品后再进行测定。
- f. 用 Bradford 法检测待测样品中的蛋白浓度(由于裂解液中含有较高浓度的 DTT, 不适合采用 BCA 法进行蛋白浓度测定)。这样就可以计算出一个样品单位重量蛋白中所含的 caspase 9 的酶活力单位。

【常见问题】

1. 测定出的 A_{405} 过低:

- A. 样品中蛋白含量太低, 裂解样品时需设法使样品中的蛋白浓度至少达到 1-3mg/ml。
- B. 样品中激活的 caspase 水平很低。首先确认凋亡现象是否明显, 如果凋亡比较明显并且确认该 caspase 是可以被激活的, 可以适当调节诱导细胞凋亡的时间, 希望能找到一个 caspase 激活比较强的时间点, 这样就可以检测出该 caspase 的激活。可以作一时间曲线, 例如诱导凋亡 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。

2. 测定出的 A_{405} 过高或者样品量不足:

测定出来的 A_{405} 读数过高时, 可以参考下表的反应体系适当减少样品的用量; 样品量不足时也可以参考下表减少样品的用量。

	空白对照	样品
检测缓冲液	40 μ l	40 μ l
待测样品	0 μ l	x μ l
裂解液	50 μ l	(50-x) μ l
Ac-LEHD-pNA (2mM)	10 μ l	10 μ l
总体积	100 μ l	100 μ l

说明: 其中 x 不超过 50, 其余检测方法同上面的使用说明所述。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。