

Caspase-9 活性检测试剂盒说明书

比色法

货号：AC10611

规格：20T/18S、50T/48S、100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系上海吉至工作人员。

试剂名称/规格	20T	50T	100T	保存条件
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	液体 20 mL×1 瓶	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	液体 120 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 0.25 mL×1 支	液体 0.55 mL×1 支	液体 1.1 mL×1 支	-20°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、标准品：pNA 标准溶液，5 mmol/L。标准溶液在 4°C条件下为浑浊状态，溶解即可变为澄清状态，不影响使用。
- 2、标准品稀释液配制：取 9 mL 试剂一加入 1 mL 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最关键酶 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 405 nm 有最大吸收峰。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、100μL 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。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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 μL 试剂二（若裂解不充分可提高至 150-200 μL），震荡重悬沉淀，置冰上静置 15 min，4°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 0.1 g 组织，加入 1 mL 试

剂二), 冰浴研磨或充分剪碎, 置冰上静置 15 min, 4°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 5 mmol/L pNA 标准品稀释至 200、100、50、25、12.5、0 μ 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 (μ L)	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, μ mol/L) 和 ΔA 标准 (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 (μ mol/L)。

2. 按酶活性增加百分比计算

$$\text{Caspase-9 活性增加百分比} = (\text{实验处理组 A 测定} - \text{A 空白管}) / (\text{实验对照组 A 测定} - \text{A 空白管}) \times 100\%$$

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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.1mL=10⁻⁴L; V 样: 加入的样本体积, 0.05mL; T: 反应时间, h; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 10³: 单位换算系数, 1 μ mol=10³nmol。

注意事项:

- 1、由于试剂一中含有还原剂 (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 活性测定值低最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, 以检测最佳的观察点。
- 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。

相关发表文献：

- [1] Zhao L , Kong X , Zhong W , et al. FTO accelerates ovarian cancer cell growth by promoting proliferation, inhibiting apoptosis, and activating autophagy[J]. Pathology - Research and Practice, 2020, 216(9):153042.
- [2] Tong W , Guo J , Yang C . Tanshinone II A enhances pyroptosis and represses cell proliferation of HeLa cells by regulating miR-145/GSDMD signaling pathway[J]. Bioence Reports, 2020, 40(4).

参考文献：

- [1] Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J, 1997, 326: 1-16.
- [2] Janicke R U, Sprengart M L, Wati M R, et al. Emerging role of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death and Differentiation, 1999, 6:99-104.

相关系列产品：

- AC10604 Caspase-1 活性检测试剂盒
- AC10605 Caspase-2 活性检测试剂盒
- AC10606 Caspase-3 活性测定试剂盒
- AC10607 Caspase-4 活性检测试剂盒
- AC10608 Caspase-5 活性检测试剂盒
- AC10609 Caspase-6 活性检测试剂盒
- AC10610 Caspase-8 活性检测试剂盒