

Caspase-9 活性检测试剂盒说明书

比色法

货号：BC3890

规格：20T、50T、100T

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	20T 规格	50T 规格	100T 规格	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	-20℃保存
试剂二	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	液体 120 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 0.25 mL×1 支	液体 0.55 mL×1 支	液体 0.55 mL×2 支	-20℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	-20℃保存

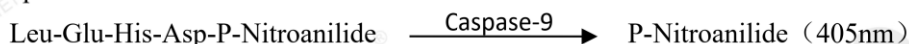
溶液的配制：

- 1、试剂一：分装-20℃保存。
- 2、试剂二：分装-20℃保存。
- 3、标准品：pNA 标准溶液，5 mmol/L。标准溶液在 4℃条件下为浑浊状态，溶解即可变为澄清状态，不影响使用。
- 4、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，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，15000g 4℃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℃，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，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释：将 5 mmol/L pNA 标准品用标准品稀释液稀释至 200、100、50、25、12.5、0 μ mol/L 的标准溶液备用。
- 3、标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 (μ mol/L)	标准溶液体积 (μ L)	标准品稀释液体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ mol/L)
1	5000	40	960	200
2	200	500	500	100
3	100	500	500	50
4	50	500	500	25
5	25	500	500	12.5
6	0	0	500	0

备注：下述实验中每个标准管需 100 μ L 标准溶液

- 4、在 96 孔板/EP 管中按下表步骤加样：

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 $^{\circ}$ 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。标准曲线只需做 1-2 次。

三、Caspase-9 活性计算

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度 (x, μ mol/L) 和 ΔA 标准 (y, 减去浓度为 0 的标准管吸光值) 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

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

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

V 反总：反应体系总体积，0.1mL=10 $^{-4}$ L；V 样：加入的样本体积，0.05mL；T：反应时间，h；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；10 3 ：单位换算系数，1 μ mol=10 3 nmol。



注意事项:

- 1、由于试剂二中含有还原剂 (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] Fang S, Sun S, Cai H, Zou X, Wang S, Hao X, Wan X, Tian J, Li Z, He Z, Huang W, Liang C, Zhang Z, Yang L, Tian J, Yu B, Sun B. IRGM/Irgm1 facilitates macrophage apoptosis through ROS generation and MAPK signal transduction: Irgm1+/- mice display increases atherosclerotic plaque stability. *Theranostics*. 2021 Sep 9;11(19):9358-9375. doi: 10.7150/thno.62797. PMID: 34646375; PMCID: PMC8490524.
- [2] Yu H, Yan J, Li Z, Song T, Ning F, Sun Y. Enhanced photothermal-ferroptosis effects based on RBCm-coated PDA nanoparticles for effective cancer therapy. *J Mater Chem B*. 2023 Jan 4;11(2):415-429. doi: 10.1039/d2tb02329f.
- [3] Chen T, Ma B, Lu S, Zeng L, Wang H, Shi W, Zhou L, Xia Y, Zhang X, Zhang J, Chen J. Cucumber-Derived Nanovesicles Containing Cucurbitacin B for Non-Small Cell Lung Cancer Therapy. *Int J Nanomedicine*. 2022 Aug 10; 17:3583-3599. doi: 10.2147/IJN.S362244. PMID: 35974872; PMCID: PMC9376005.
- [4] Tan W, Zheng Q, Feng K, Feng X, Zhong W, Liao C, Li S, Liu Y, Hu W. Neuroprotection of *Gastrodia elata* polyphenols against H₂O₂-induced PC12 cell cytotoxicity by reducing oxidative stress. *Front Pharmacol*. 2022 Nov 10; 13:1050775. doi: 10.3389/fphar.2022.1050775. PMID: 36438797; PMCID: PMC9684467.
- [5] Li F, Sun H, Lin X, Li Q, Zhao D, Cheng Z, Liu J, Fan Q. Increased cytochrome C threonine 50 phosphorylation in aging heart as a novel defensive signaling against hypoxia/reoxygenation induced apoptosis. *Aging (Albany NY)*. 2022 Jul 25;14(14):5699-5709. doi: 10.18632/aging.204159. Epub 2022 Jul 25. PMID: 35896004.

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:

- BC3810 Caspase-1 活性检测试剂盒
- BC3820 Caspase-2 活性检测试剂盒
- BC3830 Caspase-3 活性检测试剂盒
- BC3840 Caspase-4 活性检测试剂盒
- BC3850 Caspase-5 活性检测试剂盒
- BC3860 Caspase-6 活性检测试剂盒
- BC3880 Caspase-8 活性检测试剂盒

