

(本试剂仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

## Caspase 9 活性分光光度法检测试剂盒

货号：E-CK-A313

规格：20 T / 50 T / 100 T

产品编号	产品名称	20 T	50 T	100 T	Storage
E-CK-A313A	裂解液	3 mL	7.5 mL	15 mL	-20°C
E-CK-A313B	2 ×反应液	1.0 mL	1.25 mL x 2	5.0 mL	-20°C
E-CK-A313C	Ac-LEHD-pNA	100 µL	250 µL	500 µL	-20°C
E-CK-A313D	DTT	50 µL	100 µL	150 µL	-20°C
说明书			一份		

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

全国免费电话 400-9627-365  
销售部电话 027-65022280, 027-87854967  
技术部电话 027-65521719  
电子邮箱（销售） [Perry@elabscience.cn](mailto:Perry@elabscience.cn)  
电子邮箱（技术） [Flow@elabscience.cn](mailto:Flow@elabscience.cn)  
QQ 客服 800110755  
网址 [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

联系时请提供产品货号(见标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 产品简介

Elabscience®自主研发的 Caspase 9 活性检测试剂盒采用分光光度法，可用于检测细胞、组织裂解液或纯化的 Caspase 9 活性。

## 检测原理

Caspase(Cysteine-requiring Aspartate Protease)是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, Caspase 9 被认为是细胞凋亡信号转导过程中上游的一个 Caspase。线粒体释放细胞色素 c 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 Caspase3, 从而促进后续的细胞凋亡信号。Caspase 9 的激活可通过磷酸化进行调控。Caspase 9 在正常状态下以酶原的形式存在于胞浆中, 没有活性; 但在细胞发生凋亡阶段, 它被激活, 最终导致细胞凋亡。

Caspase 9 分光光度法检测试剂盒的原理是将 Caspase 9 序列特异性的多肽 (Ac-LEHD-pNA (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide)偶联至黄色发光基团 pNA (p-nitroaniline)。当该底物被 Caspase 9 剪切后, 黄色发光基团 pNA 游离出来, 可通过酶标仪或分光光度计 ( $\lambda = 405 \text{ nm}$  或  $400 \text{ nm}$ ) 测定其吸光值, 通过测定吸光度来检测 Caspase 9 的活性。

## 自备试剂

PBS(推荐使用 ELabscience®E-BC-R187)、蛋白定量试剂盒(Bradford 法,选用, 推荐使用 ELabscience®E-BC-K168-S)

## 实验操作指南

### 1. 准备工作

- A、裂解液[E-CK-A313A]溶解后混匀, 冰浴备用。
- B、裂解液工作液制备: 每 50  $\mu\text{L}$  裂解液[E-CK-A313A]中加入 0.5  $\mu\text{L}$  DTT[E-CK-A313D], 冰浴备用。

### 2. 样本处理

#### A、悬浮细胞

- 1) 诱导完成后的细胞, 2,000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞, PBS 轻轻重悬细胞并计数。
- 2) 2,000 rpm 离心 5 min, 弃上清。按照每 200 万细胞加入 50  $\mu\text{L}$  裂解液的比例加入预冷的裂解液工作液, 重悬细胞。冰浴裂解 30 min, 期间涡旋震荡 3~4 次, 每次 10 s。

#### B、贴壁细胞

- 1) 按常规方法用胰酶消化贴壁细胞, 收集细胞后 2,000 rpm 离心 5 min, 弃上清。PBS 轻轻重悬细胞并计。
- 2) 2,000 rpm 离心 5 min, 弃上清。按照每 200 万细胞加入 50  $\mu\text{L}$  裂解液的比例加入预冷的裂解液工作液, 重悬细胞。冰浴裂解 30 min, 期间涡旋震荡 3~4 次, 每次 10 s。

## C、组织样本

1) 取 50 mg 组织置于培养皿中，手术剪剪碎，加入 200  $\mu\text{L}$  预冷的裂解液工作液，在冰上用玻璃匀浆器匀浆(组织量加倍时，加入的预冷裂解液也加倍)。

2) 将匀浆好的样本转移到 1.5 mL 的离心管中，冰浴放置 5 min 裂解。

3. 12,000 rpm 在 4°C 下离心 10~15 min。

4. 小心地吸取上清转移至新的 EP 管中，并置于冰上待用。

5. 立即测定 Caspase 9 的酶活性或者 -70°C 保存样本，亦可取少量样本用 Bradford 法[E-BC-K168]测定蛋白浓度。

## 6. Caspase 9 酶活性检测

A、取 Ac-LEHD-pNA[E-CK-A313C]和 2  $\times$ 反应液[E-CK-A313B]，溶解后置于冰浴备用。

B、2  $\times$ 反应液工作液制备：每 50  $\mu\text{L}$  2  $\times$ 反应液[E-CK-A313B]加入 0.5  $\mu\text{L}$  DTT[E-CK-A313D]。

C、吸取 45  $\mu\text{L}$  含 100-200  $\mu\text{g}$  蛋白的细胞或者组织裂解上清，如体积不足 45  $\mu\text{L}$  则用裂解液工作液补足至 45  $\mu\text{L}$  (各组采用相同的蛋白含量和体系进行测定和比较)。

D、按照下表设置反应体系：

	空白对照	样品
2 $\times$ 反应液工作液	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
裂解液工作液	45 $\mu\text{L}$	0 $\mu\text{L}$
待测样品	0 $\mu\text{L}$	45 $\mu\text{L}$
Ac-LEHD-pNA	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
总体积	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

## 注意：

1) 在设置反应体系时先加入反应工作液，再加入待测样本后适当混匀，注意避免产生气泡。

2) 最后加入 Ac-IETD-pNA 并混匀，注意避免气泡产生。

E、在加入 Ac-LEHD-pNA 混匀后，37°C 孵育 2~4 h。发现颜色变化较明显时即可测定 OD<sub>405</sub>。如果颜色变化不明显可适当延长孵育时间，甚至可孵育过夜。

F、用酶标仪或分光光度计 (100  $\mu\text{L}$  比色皿) 在  $\lambda = 405 \text{ nm}$  或 400 nm 测定样本吸光值。

G、通过计算  $(\text{OD}_{\text{样本值}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}) / (\text{OD}_{\text{阳性对照}} - \text{OD}_{\text{空白对照}})$  的倍数来确定凋亡诱导剂组 Caspase 9 的活化程度。

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 1.0 nmol of the colorimetric substrate Ac-LEHD-pNA 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一个小时可以剪切1 nmol Ac-LEHD-pNA产生1 nmol 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0.2 mM，此时底物是饱和的，对于大部分样品而言，在37°C孵育4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。

## 保存条件

-20°C 保存。Ac-LEHD-pNA[E-CK-A313C]避免反复冻融，请注意适当分装和避光保存。

## 注意事项

1. 保质期 1 年。为获得最佳的使用效果，请在 3~6 个月内使用。
2. 因裂解液中含有还原剂，不适合使用 BCA 法测定蛋白浓度，测定蛋白浓度时推荐使用 Elabscience®生产的 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒[E-BC-K168]。
3. 有文献报道少数类型的细胞凋亡检测不到 Caspase 9 的激活。可能存在非依赖于 Caspase 9 活化的机制，这种情况下利用本试剂盒检测 Caspase 9 活性无明显改变，需要考虑凋亡机制中的其他信号通路。
4. 本试剂盒的裂解液可以和Elabscience®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Elabscience®其它Caspase活性检测试剂盒的检测。
5. 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°C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
6. 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凋亡的时间，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。
7. 本产品仅限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。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。