Caspase-9 活性测试盒说明书（简化版）

（货号：G018-1 适用于酶标仪或分光光度计测定）

一、产品简介

Caspase 9 活性分光光度法检测试剂盒(Caspase 9 Activity Colorimetric 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 caspase9，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。Caspase 9 也称 FLICE、MACH 或 Mch5，有时被写作 Caspase-9，通常以酶原的形式存在，在细胞凋亡的信号转导过程中被激活。Caspase 9 被认为是细胞凋亡信号转导过程中比较上游的一个 caspase。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。

Caspase-9 活性分光光度法检测试剂盒就是将 Caspase-9 序列特异性的多肽 Ac-LEHD-pNA (acetyl-Leu-Glu-His-Asp p-nitroanilide)偶联至发色基团：pNA (p-nitroaniline)；当该底物被 Caspase-9 剪切后，黄色基团 pNA 即游离出来，可通过酶标仪或分光光度计（λ=405nm 或 400nm）测定其吸光值，考察 Caspase-9 的活化程度。pNA 在 405nm 附近有强吸收。

本试剂盒适用于培养细胞及新鲜组织 Caspase-9 活性的检测。

二、试剂盒组份

组份	试剂规格			储存条件
	G018-1-1 20T	G018-1-2 50T	G018-1-3 100T	
裂解液	5.0ml	10.0 ml	15.0 ml	-20℃保存
2×反应液	1.0ml	2. 5 ml	5.0 ml	-20℃保存
Ac-LEHD-pNA	100μl	250μl	500μl	-20℃避光保存
DTT	50 μl	100 μl	150 μl	-20℃保存

本简化版说明书仅供参考

三、试剂盒以外自备仪器和试剂:

低温高速离心机、酶标仪或分光光度计（100μl的比色皿）、微量移液器、玻璃匀浆器（组织样本）1.5ml离心管、PBS、蛋白定量试剂及仪器

四、保存条件：-20℃保存，Ac-LEHD-pNA需避光保存。

五、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、裂解液工作液的准备：使用前每50μl 裂解液加入0.5μl DTT

c、2×反应液溶解后混匀并置于冰浴上备用

2、样品的处理

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，离心（2000rpm，5min）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50微升裂解液的比例加入裂解液，重悬沉淀，冰浴裂解30min，其间涡旋振荡3～4次，每次10 s；或冻融2～3次。下转第3步进行实验。

b、对于贴壁细胞：

按常规的方法用胰酶消化贴壁细胞，并收集细胞。用PBS洗涤一次，吸尽上清后，按照每200万细胞加入50微升裂解液的比例加入裂解液，重悬沉淀，冰浴裂解30min，其间涡旋振荡3～4次，每次10 s；或冻融2～3次。下转第3步进行实验。

c、对于组织样品：

每50mg固体组织置于培养皿中，手术剪剪碎成3mm×3mm左右的小块，加入50μl冰冷裂解液工作液，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。下转第3步进行实验。

3、4℃ 离心（12000rpm， 10～15min）。

4、小心吸取上清（含裂解的蛋白质）转移至新的管中，并放置冰上待用。

5、立即测定Caspase 9的酶活性或-70℃保存样品，同时可以取少量样品用Bradford法测定蛋白浓度，如果细胞较小，可以适当增加细胞的用量。

本简化版说明书仅供参考

6、Caspase 9酶活性的检测：

a、取出适量的Ac-LEHD-pNA 和2×反应液，置于冰浴上备用。

b、使用前每50μl 2×反应液加入0.5μl DTT。

c、吸取50μl含100～200μg蛋白的细胞或组织裂解上清；如体积不足50μl用裂解液补足至总体积50μl（各组均采用同样的蛋白量进行测定和比较）。如下设置反应体系：

	空白对照	样品
2×反应液	50μl	50μl
裂解液	50μl	0μl
待测样品	0μl	50μl
Ac-LEHD-pNA	5μl	5μl
总体积	105μl	105μl

d、加入Ac-LEHD-pNA后混匀，注意避免在混匀时产生气泡。37℃孵育4hr。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。

e、用酶标仪或分光光度计（100μl的比色皿）在λ=405nm或400nm测定其吸光值。

f、通过计算$OD_{诱导剂}/OD_{阴性对照}$的倍数来确定凋亡诱导剂组Caspase-9 活化程度。

7、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℃ under saturated substrate concentrations。即一个酶活力单位定义为当底物饱和时，在37℃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℃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。

本简化版说明书仅供参考