

Caspase-9 活性测定试剂盒 C1119

描述:

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。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 有最大吸光度。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。

组成 (所示为 100 次检测, 50 次检测试剂量减半)

1. 裂解缓冲液 20ml, 4 °C
2. 反应缓冲液 10ml, 4 °C
3. 底物 0.5ml, -20 °C 避光
4. 10mM pNA 标准品 0.2ml, -20 °C 避光

试剂常温运输, 到达后按要求储存, 1 年内稳定。

所需仪器: 可见分光光度计配 100 μ l 比色杯, 或酶标仪。最佳波长 405nm, 也可测 OD400~450nm 但灵敏度略降。

组织细胞准备:

Caspase 活性测定值低, 最常见原因是未发生凋亡或细胞量太少, 其次是观测时间点不恰当。诱导凋亡时, 并非剂量越大时间越长 Caspase 活性就越高。可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。通常 2×10^7 细胞或 2mg 组织裂解于 1ml 可产生 1~3mg/ml 蛋白。初次测定时, 单个测定反应可加 ~200 μ g 蛋白物对应于 2×10^6 细胞或 2 个孔的 6 孔板细胞。最少, 单个测定反应需加 20 μ g 蛋白对应于 2×10^5 个细胞或 2 个孔的 12 孔板细胞。勿用丝氨酸蛋白酶抑制剂如 E-64 和 leupeptin 以免抑制 Caspase 活性。

1. **(1)细胞裂解:** 1000g 5 分钟收集细胞, 吸尽上清。每 $2 \sim 10 \times 10^6$ 细胞加 50~100 μ l 裂解液震荡裂解, 冰浴 10 分钟, 再次震荡。**(2)组织裂解:** 3~10mg 组织加 100 μ l 裂解液放入小型玻璃匀浆器, 上下匀浆 30 次。转移匀浆液于离心管。
2. 4°C 12,000g 10 分钟, 取上清测定, 或 -70°C 保存。
3. 蛋白定量: 用 Bradford 法测定蛋白浓度。裂解液含还原剂不宜采用 BCA 法。应使蛋白浓度达到 1-3 mg/ml, 相当于每 10 μ l 待测样品含 10-30 μ g 蛋白, 否则应增加细胞用量。

测定 pNA 标准曲线:

1. 用反应缓冲液稀释 10mM pNA 标准品为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M。设置不加 pNA 的零管。
2. 每一浓度取 100 μ l 加入 96 孔板或 100 μ l 比色杯, 测定 405nm 吸光度 OD 值。
3. 每一浓度标准管 OD405 值为 x 轴, 对应的 pNA 浓度为 y 轴, 用 Excel 制作 pNA 浓度对 OD405 值的标准曲线。

样品测定操作:

1. 按下表设置 96 孔板反应体系。底物最后加入以使各管反应起始时间相同。设置不加样品的空白对照管。酶活力不足或过高, 可增加或减少样品。

- 盖紧 96 孔板盖子并用封口膜密封。37 °C 反应 2 小时，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。
- 样品管 OD405 减去空白对照 OD405，为样品 Caspase 水解底物产生的 pNA 吸光度。根据标准曲线计算其含量，并以蛋白浓度校正之。
- 测得的 Caspase 酶活性表示方法有两种。(1) Caspase 活性增加的百分比： $100\% \times \text{实验处理组 OD} / \text{实验对照组 OD}$ ，简单而可靠。(2) 样品 Caspase 酶活力单位/mg protein，精确但计算较复杂，参见说明。

反应体系参考表 (允许适当调整样品加样量)

	无样品 空白对照	高酶活性 样品	低酶活性 样品
反应缓冲液 μl	95	85	60
待测样品 μl	—	10	35
底物 μl	5	5	5
总体积 μl	100	100	100

说明:

- Caspase 酶活力单位定义：参考 Chemicon 公司 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。即当底物饱和时，一个 Caspase 酶活力单位定义为 37 °C 1 小时水解 pNA 底物，产生 1nmol 游离 pNA。根据 pNA 标准曲线和样品 OD 值，可计算出 Caspase 酶活力单位。
- 除了处理组外，可设置阳性凋亡诱导剂组，阴性实验对照可包括不具有凋亡诱导作用的试剂(如果能得到)处理组、溶剂对照组、或凋亡诱导零时间点。