

## Caspase-2 活性检测试剂盒说明书

比色法

货号：AC10605

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、标准液：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-2 也称 Ich-1 或 Nedd-2，在细胞凋亡的信号转导过程中被激活。Caspase-2 的 mRNA 具有两种不同剪切变体，其全长 mRNA 翻译的蛋白可促进凋亡，而短蛋白产物则可抑制凋亡。Caspase 2 可以被 Caspase-1、3 和 granzyme B 激活。

本试剂盒测定原理基于 Caspase-2 特异水解其多肽底物 N-acetyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-pNA (Ac-VDVAD-pNA)，释放出游离的硝基苯胺 pNA，后者呈黄色在 405 nm 具有最大吸收峰，用可见光分光光度比色方法测定。其吸光度值对应于 Caspase-2 的水解活性。

**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、100 $\mu$ L 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 $\mu$ L 试剂二（若裂解不充分可提高至 150-200  $\mu$ L），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 $\mu$ 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 ( $\mu$ 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 $\Delta A$ 测定=A 测定管-A 空白管。			立即测定 405nm 下吸光度

## 三、Caspase-2 活性计算

### 1. 标准曲线的建立:

根据标准管的浓度 (x,  $\mu$ mol/L) 和  $\Delta A$  标准 (y, 减去浓度为 0 的空白管) 做标准方程。将  $\Delta A$  测定代入标准方程得到 x ( $\mu$ mol/L)。

### 2. 按酶活性增加百分比计算

$$\text{Caspase-2 活性增加百分比} = (\text{实验处理组 A 测定} - \text{A 空白管}) / (\text{实验对照组 A 测定} - \text{A 空白管}) \times 100\%$$

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本中含有多少个酶活力单位的 caspase 酶活性。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.1mL=10<sup>-4</sup>L; 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; 10<sup>3</sup>: 单位换算系数, 1 $\mu$ mol=10<sup>3</sup>nmol。

## 注意事项:

- 1、由于试剂一中含有还原剂 (DTT), 建议将样本用水稀释 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。

**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
- AC10606 Caspase-3 活性检测试剂盒
- AC10607 Caspase-4 活性测定试剂盒
- 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
- AC10611 Caspase-9 活性检测试剂盒