کیت اندازه گیری فعالیت آنزیم کاسپاز ۳/۷ (کالریمتری)

Caspase 3/7 Activity

KCAS37

اصول کار

کاسپازها آنزیم های پروتئاز داخل سلولی هستند که در مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوز، نکروپوتوز و پایروپتوز) و التهاب نقش اساسی دارند. کاسپاز ۳ و ۷ نقش اجرایی داشته (Executioner) و در هر دو مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز نقش اساسی ایفا می کند.

در این کیت آنزیم موجود در نمونه در معرض سوبسترای کالریمتریک و مشترک هر دو آنزیم کاسپاز ۳ و ۷ قرار می گیرد. سپس این آنزیم سوبسترای متصل به کروموژن را شکسته و تولید رنگ زرد کرده که در طول موج 405 nm جذب دارد. به دلیل مشترک بودن سوبسترای کاسپاز ۳ و ۷ امکان اندازه گیری فعالیت مجزای این دو آنزیم وجود ندارد.

اصول واکنش:

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

در دمای C° 20- نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

حساسیت: 0.5 mU/mL یا nmol/min/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Cells	10×10^6	5×10^5 –1×10^6
Tissue	60 mg	40 mg

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	Caspase 3 Buffer	5 mL
2	Caspase Substrate (DEVD-pNA)	500 µL
3	Caspase Lysis Buffer	100 mL
4	Caspase Standard (pNA) 5 mM	100 µL
5	DTT	Powder
6	Positive Control	Lyophilized
7	Kit Booklet	1 PCs
8	96-well Clean photometric Plate	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر و چند کاناله
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- انکوباتور با دمای 37 °C
- دستگاه Plate Reader با طول موج 405 نانومتر

نکته: قبل از شروع، آزمایش با یک نمونه جهت مشخص ساختن مقدار نمونه به صورت پایلت (Pilot) به همراه یک استاندارد انجام شود.

- قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید.
- انجام آزمایش به صورت پایلت (Pilot) حتما توصیه می شود.

آماده سازی نمونه

هموژن کردن بافت

نمونه بافت: ۴۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در Caspase Lysis Buffer (یا بافر جایگزین) لیز کرده و سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80˚C- فریز کنید.

سلول های چسبنده

محیط را خالی و سپس سلول ها (حدود ۵۰۰ هزار سلول) را تریپسینه کرده و پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و 500 µL بافر Caspase Lysis Buffer به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 4 °C انکوبه کنید تا سلول ها لیز شوند. سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در 4 °C سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای -80˚C فریز کنید.

سلول های معلق

پس از سانتریفیوژ کردن (حدود ۷۰۰ هزار سلول) سوپرناتانت را دور ریخته و در 500 µL بافر Caspase Lysis Buffer به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 4 °C انکوبه کنید تا سلول ها لیز شوند. سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در 4 °C سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80˚C- فریز کنید.

نکته: در صورتیکه از کوکتل مهارکننده های پروتئاز استفاده می کنید، مطمئن شوید که حاوی مهارکننده های سیستئین پروتئازها مانند E-64 و leupeptin نباشد.

آماده سازی کیت

- **پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید.**
- **همه محلول ها در دمای اتاق گرم شوند.**
- **همه ویال ها قبل از انجام آزمایش اسپین شوند تا محتویات روی دیواره ها و در باقی نماند.**
- **Caspase Substrate (DEVD-pNA): آماده مصرف می باشد. در دمای 20- °C ذخیره شود. ترجیحا به مقادیر مساوی تقسیم بندی و ذخیره شود.**
- **DTT Solution: به ویال DTT پانصد میکرولیتر آب دیونیزه اضافه کنید. باقیمانده را در دمای 20- °C ذخیره کنید.**
- **Positive Control: به ویال Positive Control مقدار یک میلی لیتر از Caspase Lysis Buffer اضافه کنید. سپس تقسیم بندی کرده و در دمای 20- °C ذخیره نمایید.**

- ابتدا 50 µL از ویال استاندارد را با 450 µL از Caspase Lysis Buffer رقیق کنید تا استاندارد 500 µM حاصل شود.
- سپس بر طبق جدول زیر استاندارد ها را از ویال اصلی Caspase 3 Standard بسازید:

کد استاندارد	مقدار از استاندارد 500 µM (µL)	Caspase Lysis Buffer (µL)	غلظت نهایی (µM)
A	۰	۱۰۰۰	۰
B	۲۰	۹۸۰	۱۰
C	٤۰	۹٦۰	۲۰
D	٦۰	۹٤۰	۳۰
E	۸۰	۹۲۰	٤۰
F	۱۰۰	۹۰۰	۵۰

نحوه انجام آزمایش

۱. ابتدا در هر چاهک 50 µL از نمونه، استانداردها و یا Positive Control اضافه کنید.

نکته: بنا به دلایل آماری توصیه می شود هر نمونه به صورت دوتایی (Duplicate) انجام شود.

۲. سپس به هر چاهک 55.5 µL از محلول کاری زیر به ازای هر نمونه اضافه کنید:

- Caspase Buffer: 50 µL
- DTT: 0.5 µL
- Caspase Substrate: 5 µL

نکته: می توان محلول فوق را برای تعداد مشخص از نمونه، استاندارد و بلانک به طور همزمان آماده کرد. دقت شود که به میزان یک واکنش اضافه بر موارد فوق محلول کاری ساخته شود تا خطای سمپلر جبران شود.

۳. در ادامه به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت در دمای 37 °C انکوبه کنید.

۴. سپس جذب پلیت را در طول موج 405 nm خوانش کنید. در صورتیکه میزان جذب نمونه ها از استاندارد صفر (تیوب A) کمتر بود انکوباسیون را به صورت شبانه (Overnight) ادامه دهید و سپس خوانش را مجددا تکرار کنید.

نحوه محاسبه

۱. **ابتدا از چاهک های دوتایی میانگین بگیرید.**

۲. **جذب چاهک استاندارد صفر (تیوب A) را از همه چاهک های دیگر کم کنید.**

۳. **منحنی استاندارد pNA را با توجه به جذب آنها رسم کرده (نرم افزار Excel) و میزان µmol هر نمونه را از روی فرمول به دست آمده از منحنی محاسبه کنید.**

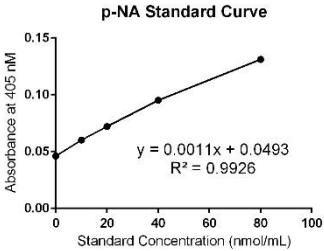
۴. **سپس فعالیت آنزیم بر اساس فرمول زیر محاسبه شود:**

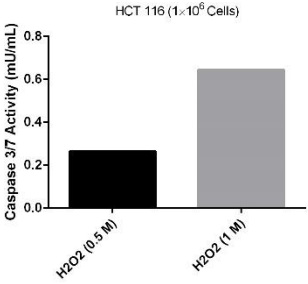
$$\text{Caspase Activity} = \frac{M \times 105.5}{T \times 50} \times \text{ضریب رقت نمونه}$$

M: µmol from standard curve plot

T: Incubated time for each sample in minutes

- **واحد فعالیت آنزیم** nmol/min/mL **یا** mU/mL **می باشد.**
- **جهت نرمال سازی مقادیر بهتر است میزان پروتئین نمونه ها سنجیده شود و مقادیر برحسب میلی گرم پروتئین نرمال سازی شوند، در این صورت می توان واحد را بر حسب** nmol/min/mg of protein **یا** mU/mg of protein **گزارش کرد.**


p-NA Standard Curve
Absorbance at 405 nM
0.15
0.10
0.05
0.00
y = 0.0011x + 0.0493
R² = 0.9926
0
20
40
60
80
100
Standard Concentration (nmol/mL)


HCT 116 (1×10^6 Cells)
Caspase 3/7 Activity (mU/mL)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
H2O2 (0.5 M)
H2O2 (1 M)

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
عدم کارکرد تست	سرد بودن بافرها و مواد	همه مواد را به دمای اتاق برسانید
	طول موج اشتباهی	سعی کنید طول موج 405nM را انتخاب کنید
	استفاده از مهارکننده پروتئاز سیستئن	از مهار کننده سیستئین پروتئازها مانندE64/leupetin استفاده نشود
نمونه با خوانش غیر عادی	عدم هموژن شدن کامل نمونه	از هموژنازیر یا سونیکاتور استفاده کنید
	نمونه چند بار فریز-دفریز شده است	اگر نیاز به چندین بار استفاده از نمونه دارید قبل از فریز کردن آن را تقسیم بندی کنید.
	نمونه های کهنه استفاده شده است	نمونه های با ذخیره بلند مدت حتما در نیتروژن ذخیره شود
	وجود عوامل مداخله گر مانند چربی و یا بافر استخراج نامناسب	عوامل مداخله گر حذف شوند و بافر مناسب استخراج استفاده شود
جذب خیلی پایین نمونه	نمونه رقیق	مقدار بافت اولیه را افزایش داده و از بافر استخراج مناسب استفاده کنید

KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com