

CODE No. 4820

MBL

Printed: November 15, 2004

Revised: September 1, 2011

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Detection of caspase activity

APOPCYTO

Caspase-8 Fluorometric Assay Kit

CODE No. 4820

100 assays

MBL MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.
URL <https://ruo.mbl.co.jp>
e-mail support@mbi.co.jp, TEL 052-238-1904

CODE No. 4820



Before use, thoroughly read these Instructions.

Description

Caspase is a member of the cysteine aspartic acid-specific protease family, which is activated by a variety of signals of death receptor ligation, DNA damages, serum starvation and stresses *etc.* Active caspase recognizes a lot of several molecules as substrates to cleave them, occurring to biological events corresponding to the apoptosis. For example, ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) is inactivated and CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) is indirectly activated by caspase-3, and it is related to chromatin fragmentation for nucleosome units. Caspase recognizes several structural proteins as a substrate to cleave them, and the cleavage is associated with the unique apoptosis cell morphology of chromatin condensation, nucleus fragmentation and cytoplasmic integrity. Active caspase could act in apoptosis process, so that detection of caspase activity is necessary for apoptosis research frequently. Though there are numerous ways to measure of caspase activity, colorimetric or fluorometric substrates are used popularly.

Assay Principle

Active caspase recognizes 4 amino acid residues in a substrate molecule, which are from the aspartate residue next to N-terminal 3 amino acid residues, and specifically cleaves at the C-terminal side of the aspartate residue. So this characterization is useful for detecting caspase activity by using synthetic substrates. In this method, 4 amino acid sequences is labeled with AMC (7-amino-4-methyl-coumarin) pNA (*p*-nitroanilide), or AFC (7-amino-4-trifluoromethyl coumarin) at the C-terminal side. Free pNA, AMC or AFC is released from the labeled synthetic substrate on cleavage by active caspase, and monitored by a 96-well microplate reader (pNA: absorbance wavelength 400 or 405 nm, AMC: excitation wavelength 380 nm, fluorescence wavelength 460 nm, AFC: excitation wavelength 400 nm, fluorescence wavelength 505 nm). For example, if caspase is active in sample, tetrapeptide-AMC as a synthetic substrate is cleaved and the excitation wavelength and the fluorescence wavelength are shifted. Because the amount of free AMC is proportional to the amount of caspase activity present in the sample, caspase activity can be calculated by monitoring of the optical density of free AMC at wavelength Excitation 380 nm/Emission 460 nm.

APOPCYTO Caspase-8 Fluorometric Assay Kit is provided to detect caspase-8 activity in cell extract with IETD-AMC as a substrate, which IETD sequence is recognized by active caspase-8 selectively. APOPCYTO Caspase-8 Fluorometric Assay Kit is composed of reagents necessary for the detection, which are Cell Lysis buffer, Reaction buffer and so on. Caspase-8 activity can be detected easily and quickly using APOPCYTO Caspase-8 Fluorometric Assay Kit.

Intended Use

For research use only. Not for use in *in vitro* diagnostic procedures for clinical diagnosis.

Product Components

Materials	Quantity	Color
Cell Lysis Buffer	50 mL × 1 vial	Clear
2X Reaction Buffer	2 mL × 3 vials	Blue
1 M DTT	500 µL × 1 vial	Yellow
Substrate IETD-AMC (2 mM)	550 µL × 1 vial	Brown
Inhibitor IETD-FMK (1 mM)	55 µL × 1 vial	Orange
10 mM AMC	200 µL × 1 vial	Green

Expiration

Please see the label of this kit.

Storage Conditions

Store at -20°C. After thaw, the Cell Lysis Buffer and 2X Reaction Buffer can be stored at 4°C.

Material to Be Supplied by the User

- microcentrifuge (For harvest cells)
- 96-well microplate reader
(For measure the fluorescence counts, Excitation 380 nm/Emission 460 nm)
- micropipette
- 96-well microplate (flat-bottom, clear polystyrene)
- microcentrifuge tube

Note

- When caspase-8 activity is not measured immediately after cell preparations, store the cell lysates or cell pellets at -20°C and use them within 1 week.
- Store caspase-8 substrate away from light.
- Ensure that DTT is added to 2X Reaction Buffer to obtain a final concentration of 10 mM before use.
- We recommend you to previously measure the fluorescence counts in the empty wells of 96-well microplate with a 380 nm excitation filter and 460 nm emission filter to avoid use of any wells with high background.

Preparation of reagents

- 1) Add DTT to 2X Reaction Buffer to obtain final concentration of 10 mM just before use. (For example, 10 μ L of 1 M DTT to 990 μ L of 2X Reaction Buffer)
- 2) Preparation of AMC (7-amino-4-methyl-coumarin) standards
 - i) Dilute 10 mM AMC to 500 μ M AMC in Cell Lysis Buffer (5 μ L of 10 mM AMC is added to 95 μ L of Cell Lysis Buffer).
 - ii) Dilute 500 μ M AMC in Cell Lysis Buffer according to the following table to give these final concentrations.

Final AMC concentration	AMC	Cell Lysis Buffer
50 μ M (5 nmol)	50 μ L of 500 μ M AMC	450 μ L
25 μ M (2.5 nmol)	250 μ L of 50 μ M AMC	250 μ L
12.5 μ M (1.25 nmol)	250 μ L of 25 μ M AMC	250 μ L
6.25 μ M (0.625 nmol)	250 μ L of 12.5 μ M AMC	250 μ L
3.125 μ M (0.312 nmol)	250 μ L of 6.25 μ M AMC	250 μ L
1.5625 μ M (0.165 nmol)	250 μ L of 3.125 μ M AMC	250 μ L
0 μ M (0 nmol)		250 μ L

Caspase Assay Protocol

1. Induce apoptosis in cells using the desired method, Concurrently incubate a control culture without induction.
2. Count the cells and harvest the $1-5 \times 10^6$ cells by centrifugation at 400 X *g* for 5 minutes.
3. Resuspend the cells in ice-cold Cell Lysis Buffer (50-500 μ L), and incubate the cells on ice for 10 minutes.
4. Centrifuge the cell lysates at 10,000 X *g* for 5 minutes at 4°C to precipitate cellular debris. Transfer the supernatants (cell extracts) to new microcentrifuge tubes and put on ice.

If necessary, total protein concentration of the cell extracts may be measured by standard protein assay methods, and adjust protein concentration to 100-200 μ g/50 μ L in Cell Lysis Buffer.

5. Add 50 μ L of 2X Reaction Buffer containing 10 mM DTT to each well of a 96-well microplate.
10 mM DTT should be added to 2X Reaction Buffer just before use.
6. Add 45 μ L of cell lysates to each well. Prepare wells which were added 45 μ L of Cell Lysis Buffer in stead of cell lysates to measure blank absorbance.

[Optional method]

To verify that the signal detected by the kit is due to protease activity, incubate an induced sample with IETD-FMK before adding substrate. Add 45 μ L of cell extracts to 50 μ L of 2X Reaction Buffer (containing 10 mM DTT) and 1 μ L of 1 mM IETD-FMK.

8. Add 5 μL of Caspase-8 Substrate to each well.
9. Cover the plate with a plate sealer and incubate at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 60 minutes.
10. Add 100 μL of AMC standards to empty wells.
11. Measure the fluorescence counts in the wells with 380 nm excitation filter and 460 nm emission filter. Calculate the specific activity (SA) of caspase-8 present in each sample using following formula:
 - i) Construct a standard curve using the fluorescence counts of AMC (7-amino-4-methyl-coumarin) standards.
 - ii) Calculate the relative absorbance (Fr) as:

$$\text{Fa} = (\text{induced apoptosis sample counts}) - (\text{blank counts})$$

$$\text{Fn} = (\text{negative sample counts}) - (\text{blank counts})$$

$$\text{Fr} = \text{Fa} - \text{Fn}$$
 - iii) Calculate liberated free AMC concentration (B μM) equal to Fr by AMC standard curve.
 - iv) Calculate caspase-8 activity (C) present in each sample as:

$$\text{C} = \text{nmole AMC liberated per hour}$$

$$= \text{BX } 0.1 \text{ mL} / \text{incubation hour}$$

$$= 0.1\text{B} / \text{incubation hour}$$
 - v) If total protein concentration of the cell extracts is D mg/mL, calculate the specific activity (SA) of caspase-8 present in each sample as:

$$\text{SA} = \text{C per } \mu\text{g protein}$$

$$= (0.1\text{B} / \text{incubation hour}) / (\text{D mg/mL} \times 0.1 \text{ mL})$$

$$= \text{B} / (\text{D} \cdot \text{incubation hour})$$

Assay Example

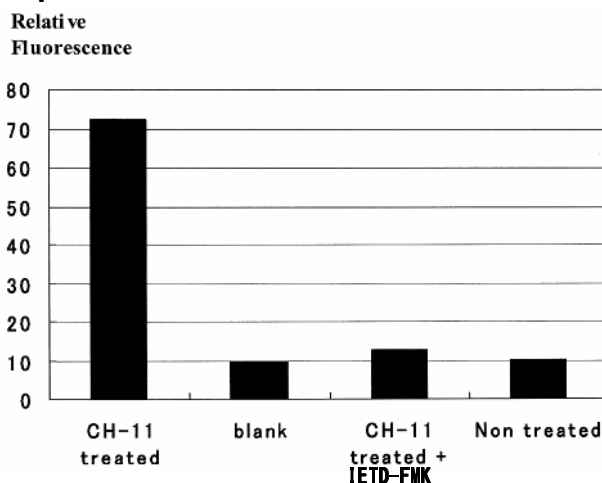


Fig.1 Caspase-8 activity in CH-11 treated Jurkat cells

After Jurkat cells were incubated with 100 ng/mL of anti-Fas monoclonal antibody (CH-11) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 4 hours. Caspase-8 activity was measured by APOPCYTO Caspase-8 Fluorometric Assay Kit.

References

- 1) Wolf, B. B., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **274**, 20049-20052 (1999)
- 2) Thornberry, N. A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **272**, 17907-17911 (1997)
- 3) Walker, N. P., *et al.*, *Cell* **78**, 343-352 (1994)
- 4) Sleath, P. R., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **265**, 14526-14528 (1990)

Manufacturer

MBL MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

URL <https://ruo.mbl.co.jp>

e-mail support@mbi.co.jp, TEL 052-238-1904

Before use, thoroughly read these Instructions.

はじめに

Caspase は Death receptor ligation、DNA 破損、血清飢餓、ストレスなど様々な細胞死のシグナルに呼応して活性化されるシステインプロテアーゼです。Caspase は非常に多くの分子を基質として認識し、切断し、アポトーシスに伴う様々な変化に密接に関係しています。たとえば、caspase-3 は ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) を不活性化させることで間接的に CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) を活性化させ、クロマチンのヌクレオソーム単位での断片化に関与します。またいくつかの構造蛋白質が caspase の基質となりこれら基質の切断が、核の凝縮、分断化、細胞の縮小といったアポトーシスに特有の形態変化に関連します。すなわち、caspase はアポトーシスの実行過程において機能します。従ってアポトーシス研究においては、しばしば caspase 活性の測定が必要となります。caspase 活性測定法として様々な方法が報告されていますが、発色基質、蛍光基質を用いた方法が最も一般的に使われています。

原理

Caspase は基質となる分子のアスパラギン酸から N 末端側 3 つ目までの 4 アミノ酸配列を認識してアスパラギン酸の C 末側で切断します。この性質を利用して caspase の活性を測定することができます。代表的な方法として合成基質を用いる方法があります。この方法では caspase によって認識される 4 アミノ酸配列の C 末端側に pNA (*p*-nitroanilide)、AMC (7-amino-4-methyl coumarin) あるいは AFC (7-amino-4-trifluoromethyl coumarin) を結合させた合成基質から遊離される pNA, AMC あるいは AFC の量を測定します。遊離される各結合物の量は、マイクロプレートリーダーを用いて測定することができます (pNA; 吸光波長 400 nm または 405 nm、AMC; 励起波長 380 nm 蛍光波長 460 nm、AFC; 励起波長 400 nm 蛍光波長 505 nm)。例えば、tetrapeptide-AMC を基質として使用した場合、caspase 活性があれば基質が切断されます。Tetrapeptide-AMC と遊離された AMC との間で蛍光スペクトラムに差が生じますので、AMC の蛍光強度を測定することで遊離された AMC の量、すなわち caspase の活性を測定することができます (図参照)。

本キットは、蛍光基質として caspase-8 に選択的配列を持つ IETD-AMC を用いて細胞抽出液中 Caspase-8 の活性を測定するためのキットです。キットには、細胞抽出液 (Cell Lysis buffer)、及び、反作用緩衝液 (Reaction buffer) など測定に必要な試薬があわせて組み込まれていますので、簡便、迅速に測定することができます。

使用上または取り扱い上の注意

本品は研究用試薬です。ヒトの体内に用いたり、診断の目的に使用しないで下さい。

キット構成

Materials	Quantity	Color
Cell Lysis Buffer	50 mL × 1 vial	Clear
2X Reaction Buffer	2 mL × 3 vials	Blue
1 M DTT	500 µL × 1 vial	Yellow
Substrate IETD-AMC (2 mM)	550 µL × 1 vial	Brown
Inhibitor IETD-FMK (1 mM)	55 µL × 1 vial	Orange
10 mM AMC (7-amino-4-methyl coumarin)	200 µL × 1 vial	Green

有効期限

キットに貼られているラベルを参照下さい。

保存温度

-20℃

Cell Lysis Buffer, 2X Reaction Buffer につきましては、融解後は 4℃で保存可能です。

測定上必要な備品、消耗品

- ・ 細胞採取用微量遠心機
- ・ 蛍光強度 (励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm) が測定可能なマイクロプレートリーダー
- ・ マイクロピペット
- ・ 96 ウェルマイクロプレート
- ・ 微量遠心管

測定上の注意

- ・ すぐに測定しない場合は-20℃でサンプルを保存し、1週間以内に測定して下さい。細胞質抽出液の状態でも保存可能ですが、なるべくセルペレットの状態で保存下さい。
- ・ Caspase-8 Substrate は光にあてないようにご注意下さい。
- ・ 2X Reaction Buffer に必ず、DTT を加えて使用下さい(終濃度 10 mM)。DTT を加えないと、活性が抑えられます。
- ・ 蛍光バックグラウンドの高いウェル使用を避けるため、反応前にプレートの蛍光強度 (励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm) を測定することをお勧めします。

試薬の調製法

- 1) Reaction Buffer の調製
2X Reaction Buffer に DTT を 10 mM となるように加えます。例えば、2X Reaction Buffer 990 μ L に 1 M DTT を 10 μ L 加えます。使用前に行ってください。
- 2) AMC (7-amino-4-trifluoromethyl coumarin) 標準液の調製
 - ① 10 mM AMC 溶液を Cell Lysis Buffer で希釈し、500 μ M の AMC 溶液を調製します。95 μ L の Cell Lysis Buffer に 5 μ L の 10 mM AMC を添加します。
 - ② 500 μ M の AMC 溶液を希釈して下記のような濃度系列を調製します。

ρ NA concentration	ρ NA	Cell Lysis Buffer
500 μ M (50 nmole)	50 μ L of 5 mM ρ NA	450 μ L
250 μ M (25 nmole)	250 μ L of 500 μ M ρ NA	250 μ L
125 μ M (12.5 nmole)	250 μ L of 250 μ M ρ NA	250 μ L
62.5 μ M (6.25 nmole)	250 μ L of 125 μ M ρ NA	250 μ L
31.25 μ M (3.125 nmole)	250 μ L of 62.5 μ M ρ NA	250 μ L
15.625 μ M (1.5625 nmole)	250 μ L of 31.25 μ M ρ NA	250 μ L
0 μ M (0 nmole)		250 μ L

操作法

1. 任意の方法で細胞にアポトーシスを誘導します。同時にアポトーシスを誘導しない細胞も用意します。誘導後、細胞数を調整し、 $1-5 \times 10^6$ 個の細胞を $400 \times g$ で 10 分間遠心しセルペレットとします。
2. セルペレットに氷冷した Cell Lysis Buffer (50-500 μ L) を加え、細胞を懸濁させた後、氷上で 10 分間静置します。
3. 微量遠心機を使用し、4 $^{\circ}$ C で 5 分間 $10,000 \times g$ で遠心し、上清（細胞抽出液）を微量遠心管に採取し、氷上に置きます。
必要に応じて、標準的な方法で蛋白質濃度を測定し、Cell Lysis Buffer で 100-200 μ g/50 μ L の濃度に調整します。
4. 2X Reaction Buffer (10 mM DTT 含) を 96 ウェルマイクロプレート各ウェルに 50 μ L ずつ添加します。
使用前に DTT を 10 mM となるように 2X Reaction Buffer に加えて下さい。例えば、990 μ L の 2X Reaction Buffer に、10 μ L の 1M DTT を添加します。
5. 細胞抽出液を各ウェルに 45 μ L ずつ添加します。バックグラウンドをとるため、細胞抽出液のかわりに Cell Lysis Buffer を 45 μ L 加えたウェルをご用意下さい。
【オプション】 必要に応じて、45 μ L の細胞抽出液に 50 μ L の 2X Reaction Buffer (10 mM DTT 含) と 1 μ L の 1 mM IETD-FMK を加えたウェルをご用意します。

6. Caspase-8 Substrate を 96 ウェルマイクロプレートの各 well に 5 μL ずつ分注し、蓋をした後、37°C で 60 分反応させます。
7. 調製した AMC 標準液をあいているウェルに 100 μL ずつ分注します。
8. マイクロプレートリーダーを用いて励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm で蛍光強度をカウントします。
9. AMC 標準液のカウントから標準曲線を作成します。
10. アポトーシス誘導サンプルと未誘導サンプルの蛍光カウントを求め、バックグラウンドのカウントを差し引いた後、標準曲線から遊離した AMC 濃度を求めます。算出された AMC 濃度から単位時間あたりの遊離 AMC 量を求め、caspase-8 活性とします。以下に詳細を示します。
 - i) AMC 標準液の吸光度から標準曲線を作成します。
 - ii) 相対蛍光カウント relative fluorescence (Fr) を求めます。
$$\text{Fa} = (\text{induced apoptosis sample counts}) - (\text{blank counts})$$
$$\text{Fn} = (\text{negative sample counts}) - (\text{blank counts})$$
$$\text{Fr} = \text{Fa} - \text{Fn}$$
 - iii) 標準曲線から、Fr における遊離 AMC 濃度 (B μM) を求めます。
 - iv) caspase-8 活性 (C) を求めます。
$$\text{C} = \text{nmole AMC liberated per hour}$$
$$= \text{B} \times 0.1 \text{ mL} / \text{incubation hour}$$
$$= 0.1\text{B} / \text{incubation hour}$$
 - v) 細胞抽出液中蛋白濃度が D mg/mL の場合、caspase-8 特異活性 specific activity (SA) は以下のように示されます。
$$\text{SA} = \text{C per } \mu\text{g protein}$$
$$= (0.1\text{B} / \text{incubation hour}) / (\text{D mg/mL} \times 0.1 \text{ mL})$$
$$= \text{B} / (\text{D} \cdot \text{incubation hour})$$

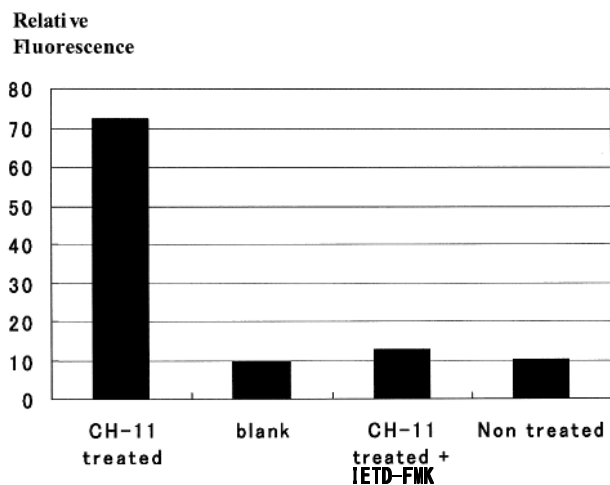
測定例

Fig.1 Caspase-8 activity in CH-11 treated Jurkat cells

After Jurkat cells were incubated with 100 ng/mL of anti-Fas monoclonal antibody (CH-11) at 37°C for 4 hours. Caspase-8 activity was measured by APOPCYTO Caspase-8 Fluorometric Assay Kit.

参考文献

- 1) Wolf, B. B., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **274**, 20049-20052 (1999)
- 2) Thornberry, N. A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **272**, 17907-17911 (1997)
- 3) Walker, N. P., *et al.*, *Cell* **78**, 343-352 (1994)
- 4) Sleath, P. R., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **265**, 14526-14528 (1990)

製造元

MBL MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

URL <https://ruo.mbl.co.jp>

e-mail support@mbi.co.jp, TEL 052-238-1904