

Caspase-1 活性测定试剂盒

Caspase-1 colorimetric assay Kit

货号: BC3810

保存: 试剂常温运输, 到达后按要求储存, 1年内稳定。

产品内容: (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 保存; |
| 2. 反应缓冲液 | 10 ml, 4 °C 保存; |
| 3. 底物 | 0.5 ml, -20 °C 避光保存; |
| 4. 10 mM pNA 标准品 | 0.2ml, -20 °C 避光保存。 |

产品介绍:

Caspase是参与细胞凋亡过程的蛋白酶家族, 包含10多个成员。其中Caspase-1是唯一可剪切IL-1b和IL-18前体产生活性细胞因子的caspase。Caspase-1剪切45kD的caspase-1前体蛋白产生20kD和10kD片断, 这两个片断可以形成异源二聚体, 并进一步形成四聚体。此四聚体具有蛋白酶活性。Caspase-1通过剪切Bcl-XL调节细胞凋亡, 并通过对细胞因子前体的剪切来调控相关细胞因子介导的免疫炎症反应。

基于Caspase-1特异水解多肽底物Tyr-Val-Ala-Asp-p-nitroanilide (YVAD-pNA), 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-1活性。

所需仪器:

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

操作步骤:

一、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。

二、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。

三、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。
2. 盖紧96孔板盖子并用封口膜密封。37 $^{\circ}$ 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。
3. 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。
4. 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 μ l	95	85	60
待测样品 μ l	—	10	35
底物 μ l	5	5	5
总体积 μ l	100	100	100

产品说明:

1. 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 $^{\circ}$ C under saturated substrate concentrations。即当底物饱和时, 一个Caspase酶活力单位定义为37 $^{\circ}$ 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。
2. 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。

参考文献:

1. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J. 326, 1-16 (1997).
2. Porter AG and Janicke RU. Emerging role of caspase-3 in apoptosis. Cell Death Differ. 6, 99-104 (1999).