

Caspase-1 活性检测试剂盒（比色法）

货号：PMK0994

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：20T/50T/100T

适用样本：动物组织、细胞

产品简介

Caspase 全称为含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyl aspartate specific proteinase)。Caspase 是一类蛋白酶家族，成员较多，该家族已显示在凋亡中起关键作用。哺乳动物 caspases 可分为三个功能组：启动子半胱天冬酶 (Caspase2、8、9 和 10)，执行者半胱天冬酶 (Caspase-3、6 和 7) 和炎性半胱天冬酶 (Caspase 1、4、5、11 和 12)。Caspase-1 (ICE，白介素-1 β -转换酶) 负责将两种炎性细胞因子白介素 1 β 和 IL-18 的蛋白水解成活性细胞因子，从而引发促炎反应。它还将加德敏 D (Gastermin D, GSDMD) 裂解为活性形式，从而导致细胞凋亡。本试剂盒基于 Caspase 1 水解肽底物 Ac-YVAD-pNA (乙酰基-Tyr-Val-Ala-Asp 对硝基苯胺)，产生黄色的对硝基苯胺 (pNA)，pNA 在 405nm 附近有强吸收，从而可以通过测定吸光度来检测 Caspase 1 的活性。

产品内容

试剂盒组分	规格			储存条件
	20T	50T	100T	
细胞裂解液	20mL	50mL	100mL	4°C
反应缓冲液 (2×)	5mL	10mL	20mL	4°C
底物	140 μ L	350 μ L	700 μ L	-20°C，避光保存
pNA 标准品 (10mM)	100 μ L	250 μ L	500 μ L	-20°C，避光保存
DTT	300 μ L	750 μ L	1.5mL	-20°C

自备耗材

酶标仪（能测 405nm 处的吸光度）

低温离心机、制冰机

96 孔板、可调节式移液枪及枪头

去离子水、磷酸盐缓冲液 (PBS)

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

细胞裂解液：使用前按 1mL 细胞裂解液加入 10 μ L DTT 的比例加入 DTT，置于冰上备用。

1×反应缓冲液（含 DTT）：使用前将反应缓冲液 (2×) 加等体积去离子水稀释到反应缓冲液 (1×)，再按 1mL 反应缓冲液 (1×) 加入 10 μ L DTT 的比例加入 DTT，置于冰上备用。

底物：即用型；实验过程中置于冰上；-20°C 保存。用不完的试剂-20°C 避光分装保存，避免反复冻融。

DTT：即用型；实验过程中置于冰上；-20°C 保存。用不完的试剂-20°C 分装保存，避免反复冻融。

标准曲线设置：取 20 μ L pNA 标准品 (10mM) 用 180 μ L 1×反应缓冲液（含 DTT）稀释至 1000 μ M pNA 标准品。用 1000 μ M pNA 按下表所示，进行下一步稀释：

	标准品体积	1×反应缓冲液（含 DTT）体积 (μ L)	浓度 (μ M)
Std. 1	200 μ L of 1000 μ M pNA	0	1000

产品说明书

Std. 2	100 μ L of Std. 1 (1000 μ M)	100	500
Std. 3	100 μ L of Std. 2 (500 μ M)	100	250
Std. 4	100 μ L of Std. 3 (250 μ M)	100	125
Std. 5	100 μ L of Std. 4 (125 μ M)	100	62. 5
Std. 6	100 μ L of Std. 5 (62. 5 μ M)	100	31. 25
Std. 7	100 μ L of Std. 6 (31. 25 μ M)	100	15. 6

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。用不完的标准品-20℃避光分装保存，避免反复冻融

样本制备

- 通过所需方法诱导细胞凋亡。同时，建议对每个样本设置不诱导的对照培养。

对于贴壁细胞，胰蛋白酶消化收集细胞。600g, 4℃离心5min, 小心吸去上清液。用1mL PBS洗涤细胞2次。离心后，去除上清液。在1mL细胞裂解液中重悬 5×10^6 个细胞。

对于悬浮细胞，600g, 4℃离心5min, 小心吸去上清液。用1mL PBS洗涤细胞2次。离心后，去除上清液。在1mL细胞裂解液中重悬 5×10^6 个细胞。

对于组织，将0.1g组织切成小块，用PBS清洗组织，加入1mL细胞裂解液，冰浴匀浆。

- 裂解物冰上孵育15-20min。

- 16,000g, 4℃离心15min，然后将上清液转移至新EP管中，置冰上待测。

- 立即测定 Caspase 1 的酶活性或-80℃保存样品。同时可以取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度。

注意：1. 推荐使用新鲜样品。如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存一个月，使用前，在冰上解冻。

2. 在样品制备步骤中请勿使用蛋白酶抑制剂，可能会干扰测定。

3. 如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

- 酶标仪预热30min以上，调节波长到405nm。

- 操作表（下述操作在96孔板中操作）：

试剂	空白孔 (μ L)	标准孔 (μ L)	测定孔 (μ L)
1×反应缓冲液（含DTT）	100	50	50
不同浓度标准品	0	50	0
样本上清	0	0	50
底物	5	5	5

- 混匀，37℃孵育1-2h，检测405nm处吸光值。空白孔记为A_空，标准孔记为A_标、测定孔记为A_测。计算 $\Delta A_{测} = A_{测} - A_{空}$, $\Delta A_{标} = A_{标} - A_{空}$ 。

注意：1. 空白孔只需测定1次。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 $\Delta A_{测}$ 小于0.001可适当加大样本量，如果 $\Delta A_{测}$ 大于1.0，用细胞裂解液适当稀释样品后再进行测定，计算结果乘以稀释倍数。

2. 在反应体系中，适当混匀，注意避免在混匀时产生气泡；3. 发现颜色变化比较明显时即可测定405nm的波长。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。

结果计算

- 标准曲线的绘制：

以 ΔA 为x轴，标准溶液浓度为y轴，绘制标准曲线（浓度为y轴更方便计算结果）。将样本的 $\Delta A_{测}$ 带入方程得到y值（ μ M即nmol/mL）。

- Caspase-1活性的计算

- 按蛋白浓度计算

产品说明书

活性单位定义：为当底物饱和时，37℃环境下，每毫克蛋白在反应体系中每小时剪切 1nmol pNA 底物产生 1nmol 游离 pNA 的酶量定义为 1 个酶活力单位。

$$\text{Caspase 1 活性 (U/mg prot)} = y \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 2.1 \times y \div Cpr \div T$$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：为当底物饱和时，37℃环境下，每克样本在反应体系中每小时剪切 1nmol pNA 底物产生 1nmol 游离 pNA 的酶量定义为 1 个酶活力单位。

$$\text{Caspase 1 活性 (U/g 鲜重)} = y \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.1 \times y \div W \div T$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：为当底物饱和时，37℃环境下，每 10^4 个细胞在反应体系中每小时剪切 1nmol pNA 底物产生 1nmol 游离 pNA 的酶量定义为 1 个酶活力单位。

$$\text{Caspase 1 活性 (U/10}^4 \text{ cell}) = y \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.1 \times y \div \text{细胞数量} \div T$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.105mL; $V_{\text{样}}$: 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; W : 样品鲜重, g; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液的体积, 1mL; 细胞数量: 以万为单位的细胞数量。

结果展示

典型标准曲线—以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。

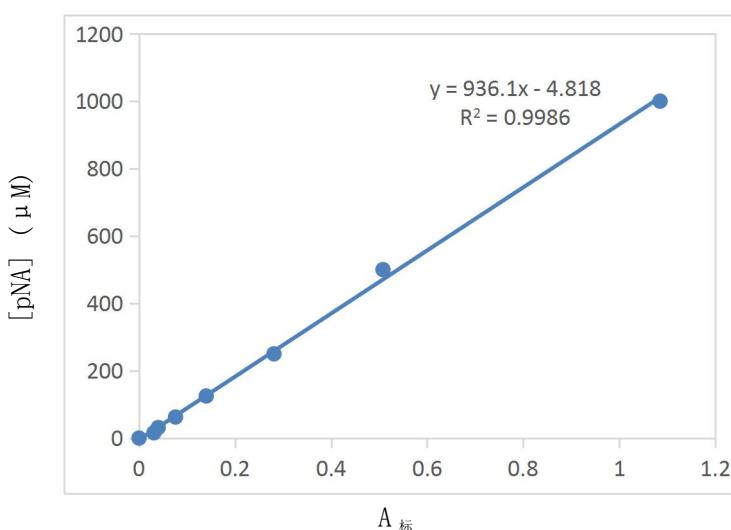


Fig. pNA 的标准曲线

相关产品：

PMK0872 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(增强型)

PMK0988 Annexin V-fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒

PMK0989 Calcein-AM/PI 活/死细胞双染色试剂盒

PMK0992 EdU-488 法细胞增殖成像检测试剂盒

PMK0993 EdU-555 法细胞增殖成像检测试剂盒

PMK0997 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)

PMK0998 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)

更多产品详情了解，请关注公众号：

