

## 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(cysteiny l 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 $\beta$ -转换酶）负责将两种炎性细胞因子白介素 1 $\beta$  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℃
反应缓冲液（2×）	5mL	10mL	20mL	4℃
底物	140 $\mu$ L	350 $\mu$ L	700 $\mu$ L	-20℃，避光保存
pNA 标准品 (10mM)	100 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	-20℃，避光保存
DTT	300 $\mu$ L	750 $\mu$ L	1.5mL	-20℃

### 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  $\mu$ 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 $\mu$ 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℃保存。用不完的试剂-20℃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℃保存。用不完的试剂-20℃分装保存，避免反复冻融。

标准曲线设置：取 20 $\mu$ L pNA 标准品（10mM）用 180 $\mu$ L 1×反应缓冲液（含 DTT）稀释至 1000 $\mu$ M pNA 标准品。用 1000 $\mu$ 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（ $\mu$ L）	浓度（ $\mu$ M）
Std. 1	200 $\mu$ L of 1000 $\mu$ M pNA	0	1000

## 产品说明书

Std. 2	100μL of Std. 1 (1000μM)	100	500
Std. 3	100μL of Std. 2 (500μM)	100	250
Std. 4	100μL of Std. 3 (250μM)	100	125
Std. 5	100μL of Std. 4 (125μM)	100	62.5
Std. 6	100μL of Std. 5 (62.5μM)	100	31.25
Std. 7	100μL of Std. 6 (31.25μM)	100	15.6

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

### 样本制备

1. 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  $5 \times 10^6$  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  $5 \times 10^6$  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。

2. 裂解物冰上孵育 15-20min。
  3. 16,000g，4℃离心 15min，然后将上清液转移至新 EP 管中，置冰上待测。
  4. 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

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 405nm。
2. 操作表（下述操作在 96 孔板中操作）：

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)
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

3. 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

1. 标准曲线的绘制：  
以  $\Delta A_{标}$  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（μM 即 nmol/mL）。
2. Caspase-1 活性的计算  
(1) 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。

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

(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。

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

(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<sup>4</sup> 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。

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

$V_{\text{反应}}$ ：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； $C_{\text{pr}}$ ：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。

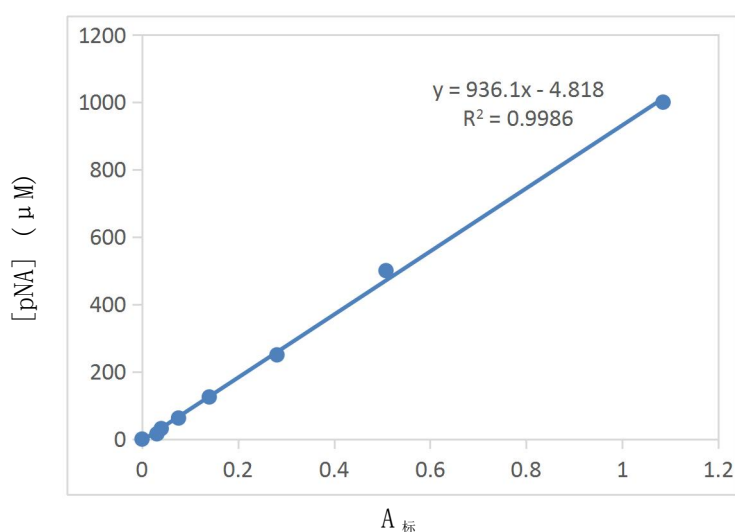


Fig. pNA 的标准曲线

### 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：