

Caspase 1 活性检测试剂盒

Caspase 1 Activity Assay Kit

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-20T	包装规格-100T
MCK-0052	裂解液	8mL	30 mL
	检测缓冲液	8mL	10mL/瓶, 共 2 瓶
	Ac-YVAD-pNA(2mM)	200μL	200μL/管, 共 5 管
	pNA(10mM)	200μL	1mL
	说明书	1 份	1 份

产品简介

Caspase 1 活性检测试剂盒(Caspase 1 Activity Assay Kit)是采用分光光度法检测细胞或组织裂解液中 caspase 1 酶活性或纯化的 caspase 1 酶活性的试剂盒。

Caspase(Cysteine-requiring Aspartate Protease)是一个在细胞凋亡过程中起重要作用的蛋白酶家族。Caspase 1 也称 interkeukin 1b converting enzyme(ICE)，有时被写作 caspase-1 或 caspase 1，是 caspase 家族中唯一可以剪切 IL-1 β 前体蛋白或 IL-18 前体产生相应成熟的细胞因子的 caspase。Caspase 1 可以剪切 45kD 的 caspase 1 前体蛋白，产生 20kD 和 10kD 的片段，这两个片段可以形成异源二聚体(heterodimer)，并进一步由两个异源二聚体形成四聚体。Caspase 1 可以通过剪切其凋亡 Bcl-XL 来调节细胞凋亡，并通过其对一些细胞因子前体的剪切来调控相关免疫反应。

本 Caspase 1 活性检测试剂盒是基于 caspase 1 可以催化底物 Ac-YVAD-pNA(acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp p-nitroanilide)产生黄色的 pNA(p-nitroaniline)，从而可以通过测定吸光度来检测 caspase 1 的活性。pNA 在 405nm 附近有强吸收。

试剂盒中提供了 caspase 1 催化产生的黄色产物 pNA，可以作为定量 caspase 1 酶活性的标准品。

本试剂盒用酶标仪检测或容量不超过 100 μL 的分光光度检测杯检测时，除标准曲线外，20T 的包装可以检测 20 个样品，100T 的包装可以检测 100 个样品。

保存条件

-20°C 保存，有效期一年。Ac-YVAD-pNA 和 pNA 需避光保存。

注意事项

- 须自备可以测定 A405 或 A400 的酶标仪或容量不超过 100 μL 的分光光度检测杯及相应分光光度计。优先考虑测定 A405，如有困难可以测定 A400。
- Ac-YVAD-pNA 需尽量避免反复冻融，请注意适当分装。
- 测定蛋白浓度需 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒，可向默科订购。建议样品用水稀释 1 倍后再用 Bradford 法测定蛋白浓度，以降低 DTT 对蛋白浓度测定的干扰。
- pNA(中文名为 4-硝基苯胺)对人体有毒，操作时请特别小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。pNA(10mM)在 4°C、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可以 20-25°C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
- 本试剂盒的裂解液可以和默科生产的其它 caspase 活性检测试剂盒的裂解液通用，即本试剂盒裂解液制备的蛋白样品可以用于默科其它 caspase 活性检测试剂盒的检测。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

1.准备工作：

- (1) 裂解液溶解后混匀并置于冰浴上备用。
- (2) 检测缓冲液溶解后混匀并置于冰浴上备用。

2.测定 pNA 标准曲线：

- (1) 标准品稀释液的配制：按照每 0.9ml 检测缓冲液加入 0.1ml 裂解液的比例配制适量的标准品稀释液。
- (2) 把试剂盒提供的 pNA (10mM)用标准品稀释液稀释为 0、10、20、50、100 和 200μM，作为标准品。
- (3) 每个浓度取 100μl 用酶标仪进行检测，或取适当量用容量不超过 100μl 的分光光度检测杯进行检测，测定 A405。
- (4) 每一个标准品的 A405 减去不含 pNA 的空白对照的 A405 计算出实际的因 pNA 而导致的吸光度，并制作出 pNA 浓度相对于 A405 的标准曲线。pNA 标准曲线可以参考图 1，在 0-200μM 范围内存在良好的线性关系。

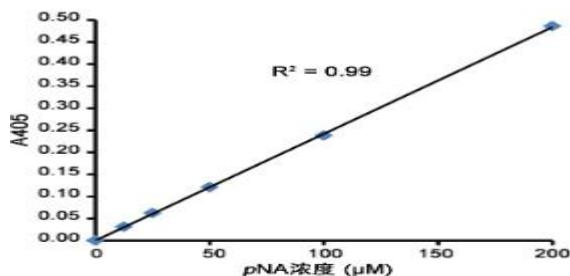


图 1.pNA 标准曲线。 (实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。)

3. 样品的收集：

- (1) 对于悬浮细胞：把没有诱导凋亡的对照样品和诱导凋亡的样品，600g 4°C 离心 5 分钟收集细胞，小心吸除上清，同时确保尽量没有细胞被吸除，PBS 洗涤一次。同前吸尽上清后，按照每 200 万细胞加入 100 微升裂解液的比例加入裂解液（如果裂解不充分，可以把裂解液的用量提高至 150 或 200 微升），重悬沉淀，冰浴裂解 15 分钟。下转步骤 3d。
- (2) 对于贴壁细胞：吸取细胞培养液，备用。用胰酶消化贴壁细胞，并收集至备用的细胞培养液中。600g 4°C 离心 5 分钟收集细胞，小心吸除上清，同时确保尽量没有细胞被吸除，PBS 洗涤一次。同前吸尽上清后，按照每 200 万细胞加入 100 微升裂解液的比例加入裂解液（如果裂解不充分，可以把裂解液的用量提高至 150 或 200 微升），重悬沉淀，冰浴裂解 15 分钟。下转步骤 3 (4)。
- (3) 对于组织样品：按照每 3-10mg 组织加入 100 微升裂解液的比例加入裂解液，在冰浴上用玻璃匀浆器匀浆。然后把匀浆液转移到 1.5mL 离心管中，冰浴再裂解 5 分钟。
- (4) 4°C 16,000-20,000g 离心 10-15 分钟。
- (5) 把上清转移到冰浴预冷的离心管中。
- (6) 立即测定 caspase 1 的酶活性或 -70°C 保存样品。同时可以取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度，尽量使蛋白浓度达到 1-3mg/mL，相当于每 10 微升待测样品中至少含有 10-30 μg 蛋白。如果细胞较小，可以适当增加细胞的用量。

4.Caspase 1 酶活性的检测：

- (1) 取出适量的 Ac-YVAD-pNA(2mM)，置于冰浴上备用。
- (2) 如下设置反应体系：

	空白对照	样品
检测缓冲液/ μL	40	40
待测样品/ μL	0	50
裂解液/ μL	50	0
Ac-YVAD-pNA(2mM)/ μL	10	10
总体积/ μL	100	100

注意：在设置反应体系时先加检测缓冲液，再加待测样品，适当混匀，注意避免在混匀时产生气泡。随后再加入 10 μl Ac-YVAD-pNA(2mM)。

(3) 加入 Ac-YVAD-pNA(2mM)后混匀，注意避免在混匀时产生气泡。37°C 孵育 60-120 分钟。发现颜色变化比较明显时即可测定 A₄₀₅。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。

(4) 样品的 A₄₀₅ 扣除空白对照的 A₄₀₅，即为样品中 caspase 1 催化产生的 pNA 产生的吸光度。通过同步骤 1 中获得的标准曲线的对比就可以计算出样品中催化产生了多少量的 pNA。

(5) 参考 Chemicon 公司的 caspase 1 酶活力单位的定义：One unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0nmol of the colorimetric substrate Ac-YVAD-pNA per hour at 37°C under saturated substrate concentrations。即一个酶活力单位定义为当底物饱和时，在 37°C 一个小时可以剪切 1nmol Ac-YVAD-pNA 产生 1nmol pNA 的 caspase 1 的酶量。这样就可以计算出样品中含有多少个酶活力单位的 caspase 1。

说明：在本试剂盒的检测体系中，底物的起始浓度为 0.2mM，此时底物是饱和的，对于许多样品而言在 37°C 孵育 2 个小时以内底物都是饱和的；对于样品中 caspase 1 酶活力特别高的情况，须用裂解液适当稀释样品后再进行测定。

(6) 用 Bradford 法检测待测样品中的蛋白浓度(由于裂解液中含有较高浓度的 DTT，不适合采用 BCA 法进行蛋白浓度测定)。这样就可以计算出一个样品单位重量蛋白中所含的 caspase 1 的酶活力单位。