

Caspase 1活性检测试剂盒

产品编号: MA0327 规格: 20T

产品编号: MA0327-L 规格: 100T

产品内容:

产品组成	20T	100T
裂解液 (Lysis buffer)	8ml	30ml
检测缓冲液 (Assay buffer)	8ml	20ml
Ac-YVAD-pNA(2mM)	200ul	1ml
pNA(10mM)	200ul	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interleukin 1 β 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 11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。

本试剂盒是基于caspase 1可以催化底物Ac-YVAD-pNA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。

本试剂盒用酶标仪检测或容量不超过100 μ l的分光光度检测杯检测时, 除标准曲线外可以检测20个样品(20T)或者100个样品(100T)。

使用说明:

1. 准备工作:

- 裂解液溶解后混匀并置于冰浴上备用。
- 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:

- 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。
- 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200 μ M, 作为标准品。
- 每个浓度取100 μ l用酶标仪进行检测, 或取适当量用容量不超过100 μ l的分光光度检测杯进行检测, 测定A405。
- 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0-200 μ M范围内存在良好的线性关系。

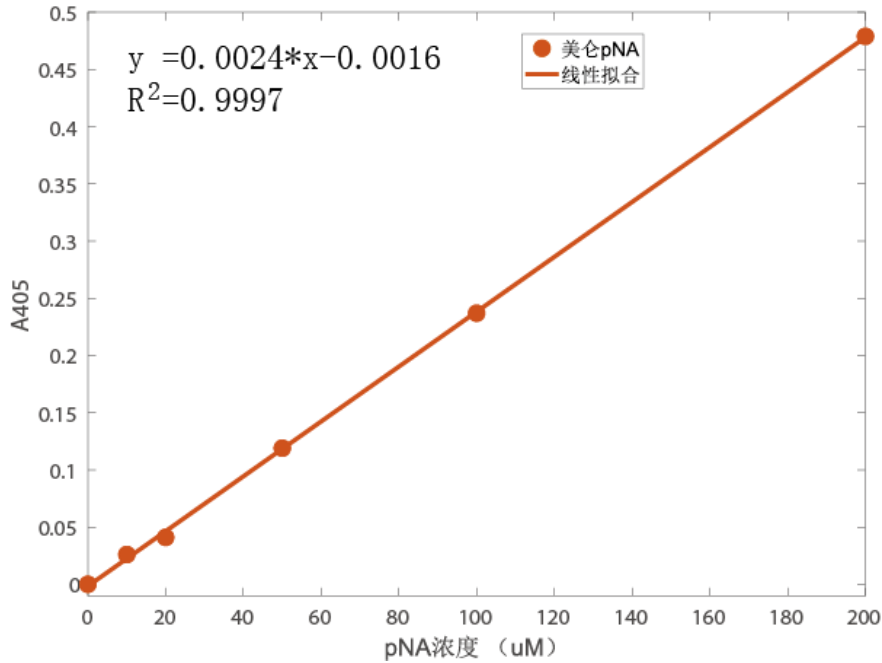


图1. pNA标准曲线。实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

3. 样品的收集:

- 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℃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，重悬沉淀，冰浴裂解15分钟。下转步骤3d。
- 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℃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，重悬沉淀，冰浴裂解15分钟。下转步骤3d。
- 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℃ 16,000-20,000g离心10-15分钟。
- 把上清转移到冰浴预冷的离心管中。
- 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，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10-30μg蛋白。如果细胞较少，可以适当增加细胞的用量。

4. Caspase 1 酶活性的检测:

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

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

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10μl Ac-YVAD-pNA (2mM)。

- 加入Ac-YVAD-pNA (2mM)后混匀，注意避免在混匀时产生气泡。37℃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。

d. 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中获得的标准曲线对比就可以计算出样品中催化产生了多少量的pNA。

e. 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一个小时内可以剪切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。

f. 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。

保存条件

-20°C保存，Ac-YVAD-pNA和pNA需要避光保存。

常见问题

1. 测定出的A405过低：

a. 样品中蛋白含量太低，裂解样品时需设法使样品中的蛋白浓度至少达到1-3mg/ml。

b. 样品中激活的caspase水平很低。首先确认凋亡现象是否明显，如果凋亡比较明显并且确认该caspase是可以被激活的，可以适当调节诱导细胞凋亡的时间，希望能找到一个caspase激活比较强的时间点，这样就可以检测出该caspase的激活。可以作一时间曲线，例如诱导凋亡0、2、4、8、16和24小时，或0、1、2、4、8和16小时，或0、1、2、4、6和8小时等。具体的诱导凋亡时间需根据具体情况而定。

2. 测定出的A405过高或者样品量不足：

测定出来的A405读数过高时，可以参考下表的反应体系适当减少样品的用量；样品量不足时也可以参考下表减少样品的用量。

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

说明：其中 $x \leq 50$ ，其余检测方法同前文所述。