

产品名称: Caspase-1 活性检测试剂盒 (比色法) -50T

产品货号: REK0007

产品概述

Caspase-1 也称 interleukin 1β converting enzyme (ICE), 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 45 kD 的 Caspase 1 前体蛋白, 产生 20 kD 和 10 kD 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 Bcl-XL 来调节细胞凋亡, 并通过剪切细胞因子的前体来调节相关的免疫反应, 也可以通过水解 Gastermin D (GSDMD)来调节细胞焦亡。

Caspase-1 活性检测试剂盒 (比色法), 基于活化的 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 405 nm 附近有强吸收。

产品组成

Component Number	Component	REK0007-50T
1	裂解液	10 mL
2	检测缓冲液	3 ml
3	Ac-YVAD-pNA (5 mM)	300 μ L
4	pNA 标准品 (10 mM)	100 μ L

保存条件

冰袋 (wet ice) 运输; -20 $^{\circ}$ C保存, Ac-YVAD-pNA 和 pNA 标准品需避光保存; 12 个月有效。

操作步骤

1. 样品准备:

1.1. 组织样品: 按照每 10~50 mg 组织加入 100 μ L 裂解液的比例加入裂解液, 在冰上用玻璃匀浆器匀浆。然后把匀浆液转移到 1.5 mL 离心管中, 冰浴继续裂解 5-10 分钟。4 $^{\circ}$ C, 10000 g 离心 10-15 分钟, 取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度 (BCA 法, BC00006) 测定。

1.2. 细胞样品: 收集细胞, 用 PBS 清洗一次, 大约每 200 万个细胞加 50 μ L 裂解液, 吹散后, 冰浴裂解 30 分钟, 每 10 分钟震荡 30 秒, 4 $^{\circ}$ C, 10000 g 离心 10-15 分钟, 取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度 (BCA 法, BC00006) 测定。

2. Caspase-1 活性的检测:

2.1. 按照下列反应体系添加试剂:

	样本	空白
待测样本	45 μ L	
裂解液		45 μ L
检测缓冲液	50 μ L	50 μ L
Ac-YVAD-pNA (5 mM)	5 μ L	5 μ L

产品名称: Caspase-1 活性检测试剂盒 (比色法) -50T

产品货号: REK0007

注：尽量保证样本的细胞数一致或者蛋白浓度一致。对于样品中 Caspase 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；组织样本如本底颜色深，需要做样本对照（不添加底物）。

2.2. 加入 Ac-YVAD-pNA 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。

2.3. 用酶标仪检测样品 405 nm 处吸光值，扣除空白对照的吸光值，即为样品中 Caspase-1 催化产生的 pNA 产生的吸光值 (ΔA_{405})。

2.4. 通过计算 OD 诱导组/OD 阴性对照组的倍数，来确定凋亡诱导组 Caspase-1 活化的程度。或者通过标准曲线计算酶活力单位。

3. 标准曲线制作 (可选)：

3.1. 标准品稀释液的配制：pNA 标准品 (10 mM) 使用 PBS 缓冲液或生理盐水稀释 50 倍后为 200 $\mu\text{mol/L}$ ，然后 2 倍逐级稀释至 100、50、25、12.5、6.25、3.125、0 $\mu\text{mol/L}$ ，作为标准品。

3.2. 每个浓度取 100 μL 用酶标仪检测 405 nm 处吸光度 (A_{405})。

3.3. 每一个标准品的 A_{405} 减去不含 pNA 的空白对照的 A_{405} ，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 A_{405} 的标准曲线 $y=ax+b$ 。

3.4. 酶活定义：当底物饱和时，在 37°C 一个小时内可以剪切 1 nmol Ac-YVAD-pNA 产生 1 nmol pNA 所需 Caspase-1 酶量定义为一个酶活单位。

3.5. 酶活计算：

$$\text{Activity, U/mg} = (\Delta A_{405} - b) / a * D / T / C_{pr}$$

注：D 为样本稀释倍数；T 为检测时间，单位小时 (H)；C_{pr} 为样本加入检测体系前的浓度，单位 mg/mL

注意事项

1. pNA 标准品 (10 mM) 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。
2. 收集细胞沉淀后立即检测或者 -80°C 保存备用，尽快检测避免蛋白酶降解导致检测失败。
3. 建议使用 EnkiLife 生产的蛋白浓度测定试剂盒 (BCA 法) (BC00006)。样品用水稀释 1 倍后再用 BCA 法测定蛋白浓度，以降低 DTT 对蛋白浓度测定的干扰。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。