

Caspase-1活性测定试剂盒

产品货号: BA1976

产品规格: 20T/50T/100T

产品简介:

Caspase是参与细胞凋亡过程的蛋白酶家族,包含10多个成员。Caspase-1是唯一可剪切IL-1b和IL-18前体产生活性细胞因子的caspase。Caspase-1通过剪切Bcl-XL调节细胞凋亡,并通过对细胞因子前体的剪切来调控相关细胞因子介导的免疫炎症反应。

基于Caspase-1特异水解多肽底物Tyr-Val-Ala-Asp-p-nitroanilide (YVAD-pNA),释放的游离硝基苯胺pNA在405nm有最大吸收峰。采用可见光光度比色法测定pNA而得到Caspase活性。适用于检测哺乳动物组织、细胞Caspase-1活性。

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

产品名称	20T	50T	100T	保存条件
试剂一	液体20mL×1瓶	液体20mL×1瓶	液体25mL×1瓶	-20℃
试剂二	液体30mL×1瓶	液体60mL×1瓶	液体120mL×1瓶	-20℃
试剂三	液体0.25mL×1支	液体0.55mL×1支	液体0.55mL×2支	-20℃
标准品	液体1mL×1支	液体1mL×1支	液体1mL×1支	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂一: 分装-20℃保存。
2. 试剂二: 分装-20℃保存。
3. 标准液: pNA标准溶液, 5mmol/L。标准溶液在4℃条件下为浑浊状态, 溶解即可变为澄清状态, 不影响使用。
4. 标准品稀释液配制: 取9mL试剂一加入1mL试剂二, 充分混匀待用。(也可按照试剂一: 试剂二=9:1的比例, 自行配制)。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、100 μL玻璃比色皿/96孔板、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤 (仅供参考):

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 培养细胞: 先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细胞数量 (约 10^6 个) 加100 μL试剂二 (若裂解不充分可提高至150-200 μL), 震荡重悬沉淀, 置冰上静置15min, 4℃, 15000g离心10-15min, 取上清置冰上待测。
2. 组织: 按照组织质量 (g): 试剂二体积 (mL) 为1: 5~10的比例 (建议称取约0.1g组织, 加入1mL试剂二), 冰浴研磨或充分剪碎, 置冰上静置15min, 4℃, 15000g离心10-15min, 取上清置冰上待测。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上, 调节波长至405nm, 蒸馏水调零。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

2. 临用前用标准品稀释液将5mmol/L pNA标准品稀释至200、100、50、25、12.5、0 μmol/L的标准溶液待用。
3. 样本测定（在96孔板/EP管中按顺序加入以下试剂）

试剂名称（μL）	测定管	空白管	标准管
试剂一	40	40	
样本	50		
试剂二		50	
试剂三	10	10	
标准溶液			100
混匀，盖紧96孔板盖子并用封口膜密封。37℃孵育60-120分钟。发现颜色变化比较明显时即可测定405nm处吸光值。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。空白管只需做1-2次。计算 ΔA测定=A测定管-A空白管。			立即测定405nm下吸光度

三、Caspase-1 活性计算

1. 标准曲线的建立：

根据标准管的浓度（x，μmol/L）和吸光度（y，减去浓度为0的空白管）做标准方程。将ΔA测定代入标准方程得到 x（μmol/L）。

2. 按酶活性增加百分比计算

Caspase-1活性增加百分比=（实验处理组A测定-A空白管）/（实验对照组A测定-A空白管）×100%

该方法简单可靠，可粗略反应酶活性情况。

3. 按酶活计算

参考Chemicon公司的caspase酶活力单位的定义：One unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0 nmol of the colorimetric pNA-substrate 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℃一个小时内可以剪切1nmol pNA底物产生1nmol游离pNA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酶活性。

Caspase-1活性（U/mg prot）=x×V反总÷（V样×Cpr）÷T×10³=2x÷Cpr÷T

V反总：反应体系总体积，0.1mL=10⁻⁴L；V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；10³：单位换算系数，1 μmol=10³nmol。

注意事项：

1. 由于试剂二一中含有还原剂（DTT），建议将样品用水稀释2倍后，用Bradford法测定蛋白浓度，以降低DTT对蛋白浓度测定的干扰。不建议使用BCA法测定蛋白浓度。
2. Caspase活性测定值低最常见的原因是细胞未发生凋亡或细胞量太少，其次是观测时间不恰当。诱导凋亡时，并非剂量越大时间越长Caspase活性就越高。建议设置不同剂量和时间点如0、2、4、8、16、24小时，以检测最佳的观察点。
3. 所测样本的值高于标准曲线上限时，可用试剂二稀释样本后重新测定。
4. 盖紧96孔板盖子并用封口膜密封。37°C孵育，肉眼可见颜色变黄时的OD405值约为0.2，此时即可测定。颜色变化不明显可延长反应或过夜，但酶活性较强时，孵育时间过长将导致反应失去线性关系。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com