

## Caspase-1 活性检测试剂盒

(本试剂盒仅供科研使用)

### 产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0712	Caspase-1 活性检测试剂盒	100T

### 产品内容

名称	规格	储存条件
裂解缓冲液	20mL	-20℃, 避光; 避免反复冻融。
检测缓冲液	10mL	
Ac-YVAD-pNA (2mM)	1mL	
pNA (10mM)	1mL	

### 一、产品说明

半胱氨酸依赖性天冬氨酸定向蛋白酶 (Caspases) 是半胱氨酸蛋白酶家族的一员, 在细胞凋亡、坏死和炎症中发挥着重要作用。Caspase 的顺序激活在细胞凋亡中发挥着重要作用。Caspase-1 (Interleukin 1 $\beta$  converting enzyme (ICE)) 是一种白细胞介素-1 转换酶, 可将炎症细胞因子 IL-18 和 IL-1 $\beta$  的前体蛋白水解为活性形式, 通过剪切 Bcl-XL 调节细胞凋亡, 并通过对各种细胞因子的作用在调节宿主对炎症刺激的反应中发挥关键作用。

翼飞雪 Caspase 1 活性检测试剂盒基于分光光度法检测 Caspase 1 的活性, Caspase 1 可以催化底物 Ac-YVAD-pNA 并产生黄色的游离 pNA, 使用分光光度计在 405 nm 对 pNA 的发光进行定量, 进而确定 Caspase 1 的活性。

### 二、样品准备

- 1、组织: 按照 3-10mg 组织: 50-100 $\mu$ L 裂解缓冲液的比例, 加入裂解缓冲液, 冰上充分匀浆后, 将匀浆液冰上冰浴 5min。
- 2、悬浮细胞: 4 $^{\circ}$ C 600g 离心 5min 收集细胞, 弃上清, 加入 PBS 洗涤细胞。按照  $2 \times 10^6$  细胞: 50-100 $\mu$ L 裂解缓冲液的比例, 充分悬浮细胞, 冰上冰浴 30min。
- 3、贴壁细胞: 小心吸取培养液保存备用。加入适量胰蛋白酶消化细胞, 再加入前面收集的 培养液, 轻轻混匀。4 $^{\circ}$ C 600g 离心 5min 收集细胞, 弃上清, 加入 PBS 洗涤细胞。按照  $2 \times 10^6$  细胞: 50-100 $\mu$ L 裂解缓冲液的比例, 充分悬浮细胞, 冰上冰浴 30min。
- 4、4 $^{\circ}$ C 16000-20000g 离心 10-15min, 取上清至预冷的离心管中。

注: 1) 收集的上清可立即进行酶活检测, 或于 -80 $^{\circ}$ C 储存。

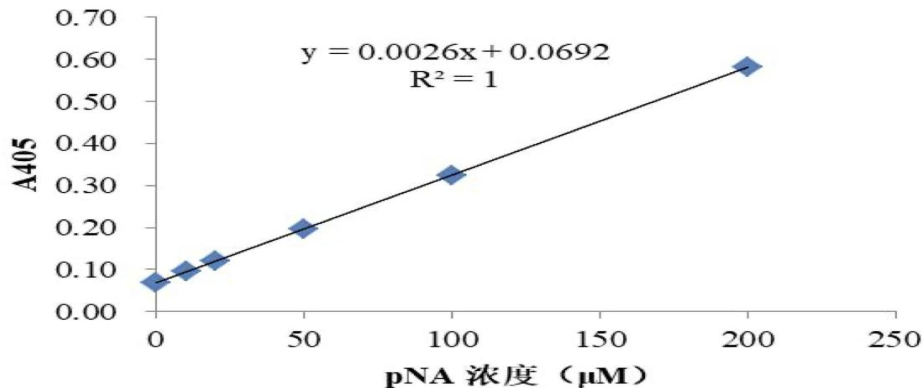
2) 取少量上清通过 Bradford 法测定蛋白浓度, 蛋白浓度在 5mg/mL 左右最佳。

### 三、活性测定

为获取更可靠的检测结果, 建议每个样品设置 2-3 个平行孔。

1、pNA 标准曲线的制备: 按照每 0.9mL 检测缓冲液渐入 0.1mL 裂解缓冲液的比例配制适量的标准品稀释液, 用标准品稀释液将 pNA (10mM) 稀释至 0、10、20、50、100、200 $\mu$ M 作为标准品。每个浓度各取 100 $\mu$ L 用酶标仪或分光光度计测定 A405, 依据标准品浓度 (x,

$\mu\text{M}$ ) 和吸光度 (y, 减去浓度为 0 的空白管的 A405) 制作标准曲线。pNA 标准曲线可参考下图, 在 0-200 $\mu\text{M}$  范围内存在良好的线性关系。



2、操作表: 按照下表依次加入试剂。

试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	样本孔	空白孔
检测缓冲液	80	80
样本	10	0
裂解缓冲液	0	10
Ac-YVAD-pNA (2mM)	10	10

3、37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1-2h, 颜色变化比较明显时测定 A405。

4、计算 A405 样品 - A405 空白的值, 即为样品中 Caspase-1 催化产生的 pNA 的吸光度, 根据标准曲线计算出对应的 pNA 的量。

**注: 一个酶活单位可定义为当底物饱和时, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  1h 内剪切 1nmol Ac-YVAD-pNA 产生 1nmol pNA 的 Caspase-1 的量。**

5、用 Bradford 法测定待测样品的蛋白浓度 (若裂解液中含有较高浓度的 DTT, 则不适合采用 BCA 法), 即可计算出样品中单位重量蛋白中所含 Caspase-1 的酶活单位。

#### 四、注意事项

1、在本试剂盒的检测体系中, 底物起始浓度为 0.2 mM。对于大多数样品, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 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, 必须用裂解液稀释后再进行测定。

2、Ac-YVAD-pNA 可适当分装, 避免反复冻融。

3、pNA 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。

4、pNA (10mM) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、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, 20-25 $^{\circ}\text{C}$  水浴全部融解即可使用。

5、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。