Caspase-5 活性测定试剂盒 C1115

描述：Caspase 是参与细胞凋亡过程的蛋白酶家族，包含 10 多个成员。Caspase-5 分子量 47.7kD，与 ICE 有 51%的同源性，在过量表达时可诱导凋亡发生。测定原理：Caspase-5 特异水解多肽底物 WEHD-*p*NA (Trp-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilide)，释放的游离硝基苯胺 *p*NA 在 405nm 有最大吸光度。采用可见光光度比色法测定 *p*NA 而得到 Caspase 活性。适用于检测哺乳动物组织、细胞 Caspase-5 活性。

组成 (所示为 100 次检测, 50 次检测试剂量减半)

1. 裂解缓冲液 20ml, 4 °C
2. 反应缓冲液 10ml, 4 °C
3. 底物 0.5ml, -20 °C 避光
4. 10mM *p*NA 标准品 0.2ml, -20 °C 避光

试剂常温运输，到达后按要求储存，1 年内稳定。

所需仪器：

可见光分光光度计配 100μl 比色杯，或酶标仪。最佳波长 405nm，也可测 OD400~450nm 但灵敏度略降。

组织细胞准备：

Caspase 活性测定值低，最常见原因是未发生凋亡或细胞量太少，其次是观测时间点不恰当。诱导凋亡时，并非剂量越大时间越长 Caspase 活性就越高。可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。通常 2×10^7 细胞或 2mg 组织裂解于 1ml 可产生 1~3mg/ml 蛋白。初次测定时，单个测定反应可加~200μg 蛋白物对应于 2×10^6 细胞或 2 个孔的 6 孔板细胞。最少，单个测定反应需加 20μg 蛋白对应于 2×10^5 个细胞或 2 个孔的 12 孔板细胞。勿用丝氨酸蛋白酶抑制剂如 E-64 和 leupeptin 以免抑制 Caspase 活性。

1. **(1)细胞裂解**：1000g 5 分钟收集细胞，吸尽上清。每 2~10×10^6 细胞加 50~100μl 裂解液震荡裂解，冰浴 10 分钟，再次震荡。(2)**组织裂解**：3~10mg 组织加 100μl 裂解液放入小型玻璃匀浆器，上下匀浆 30 次。转移匀浆液于离心管。
2. 4°C 12,000g 10 分钟，取上清测定，或-70°C 保存。
3. 蛋白定量：用 Bradford 法测定蛋白浓度。裂解液含还原剂不宜采用 BCA 法。应使蛋白浓度达到 1-3mg/ml，相当于每 10 μl 待测样品含 10-30μg 蛋白，否则应增加细胞用量。

测定 *p*NA 标准曲线：

1. 用反应缓冲液稀释 10mM *p*NA 标准品为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125μM。设置不加 *p*NA 的零管。
2. 每一浓度取 100μl 加入 96 孔板或 100μl 比色杯，测定 405nm 吸光度 OD 值。
3. 每一浓度标准管 OD405 值为 *x* 轴，对应的 *p*NA 浓度为 *y* 轴，用 *Excel* 制作 *p*NA 浓度对 OD405 值的标准曲线。

样品测定操作：

1. 按下表设置 96 孔板反应体系。底物最后加入以使各管反应起始时间相同。设置不加样品的空白对照管。酶活力不足或过高，可增加或减少样品。
2. 盖紧 96 孔板盖子并用封口膜密封。37 °C 反应 2 小时，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。

3. 样品管 OD405 减去空白对照 OD405，为样品 Caspase 水解底物产生的 *p*NA 吸光度。根据标准曲线计算其含量，并以蛋白浓度校正之。
4. 测得的 Caspase 酶活性表示方法有两种。(1) Caspase 活性增加的百分比：100% × 实验处理组 OD / 实验对照组 OD，简单而可靠。(2)样品 Caspase 酶活力单位/mg protein，精确但计算较复杂，参见说明。

反应体系参考表 *(允许适当调整样品加样量)*

	无样品 空白对照	高酶活性 样品	低酶活性 样品
反应缓冲液 μl	95	85	60
待测样品 μl	—	10	35
底物 μl	5	5	5
总体积 μl	100	100	100

说明：

1. Caspase 酶活力单位定义：参考 Chemicon 公司 One unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0 nmol of the colorimetric *p*NA-substrate per hour at 37 °C under saturated substrate concentrations。即当底物饱和时,一个 Caspase 酶活力单位定义为 37 °C 1 小时水解 *p*NA 底物，产生 1nmol 游离 *p*NA。根据 *p*NA 标准曲线和样品 OD 值，可计算出 Caspase 酶活力单位。
2. 除了处理组外，可设置阳性凋亡诱导剂组，阴性实验对照可包括不具有凋亡诱导作用的试剂(如果能得到)处理组、溶剂对照组、或凋亡诱导零时间点。