



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

Caspase 1活性检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C1101	Caspase 1活性检测试剂盒	20次

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interkeukin 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caspase 1活性检测试剂盒是基于caspase 1可以催化底物Ac-YVAD-pNA (acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp p-nitroanilide)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。
- 试剂盒中提供了caspase 1催化产生的黄色产物pNA, 可以作为定量caspase 1酶活性的标准品。
- 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。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C1101-1	裂解液	8ml
C1101-2	检测缓冲液	8ml
C1101-3	Ac-YVAD-pNA (2mM)	200 μ l
C1101-4	pNA (10mM)	200 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, Ac-YVAD-pNA和pNA需避光保存。

注意事项:

- 须自备可以测定A405或A400的酶标仪或容量不超过100 μ l的分光光度检测杯及相应分光光度计。优先考虑测定A405, 如有困难可以测定A400。
- Ac-YVAD-pNA需尽量避免反复冻融, 请注意适当分装。
- 测定蛋白浓度需Bradford蛋白浓度测定试剂盒(P0006), 可向碧云天订购。建议样品用水稀释1倍后再用Bradford法测定蛋白浓度, 以降低DTT对蛋白浓度测定的干扰。
- pNA (中文名为4-硝基苯胺) 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。pNA (10mM)在4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C水浴温育片刻至全部融解后使用。
- 本试剂盒的裂解液可以和碧云天生产的其它caspase活性检测试剂盒的裂解液通用, 即本试剂盒裂解液制备的蛋白样品可以用于碧云天其它caspase活性检测试剂盒的检测。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 准备工作:

- a. 裂解液溶解后混匀并置于冰浴上备用。
- b. 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:

- a. 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。
- b. 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。
- c. 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。
- d. 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0-200μM范围内存在良好的线性关系。

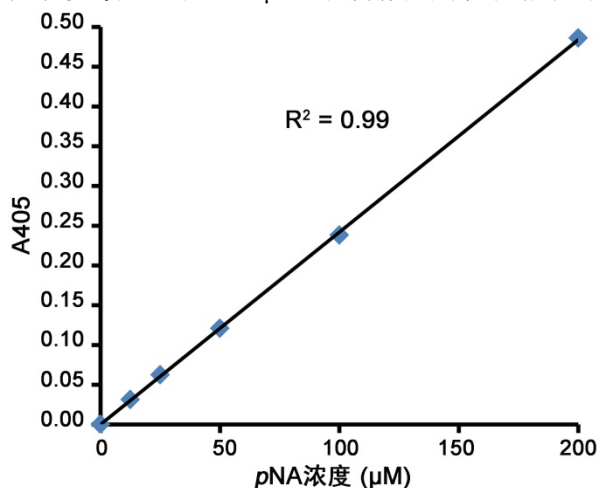


图1. pNA标准曲线。实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

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°C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（如果裂解不充分，可以把裂解液的用量提高至150或200微升），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°C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（如果裂解不充分，可以把裂解液的用量提高至150或200微升），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°C 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-70°C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。如果细胞较小，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	100μl	100μl

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°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。
- 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。通过同步步骤1中获得的标准曲线的对比就可以计算出样品中催化产生了多少量的pNA。
- 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。
- 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。

常见问题:

1. 测定出的A405过低:

- 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	100μl	100μl

说明：其中x不超过50，其余检测方法同上面的使用说明所述。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C1101	Caspase 1 活性检测试剂盒	20次
C1102	Caspase 1 活性检测试剂盒	100次
C1107	Caspase 2 活性检测试剂盒	20次
C1108	Caspase 2 活性检测试剂盒	100次
C1115	Caspase 3 活性检测试剂盒	20次
C1116	Caspase 3 活性检测试剂盒	100次
C1121	Caspase 4 活性检测试剂盒	20次
C1122	Caspase 4 活性检测试剂盒	100次
C1135	Caspase 6 活性检测试剂盒	20次
C1136	Caspase 6 活性检测试剂盒	100次
C1151	Caspase 8 活性检测试剂盒	20次
C1152	Caspase 8 活性检测试剂盒	100次
C1157	Caspase 9 活性检测试剂盒	20次
C1158	Caspase 9 活性检测试剂盒	100次
P0006	Bradford蛋白浓度测定试剂盒	1000次

使用本产品的文献:

- Li P, Yin Y, Yu Q, Yang Q. Lactobacillus acidophilus S-layer protein-mediated inhibition of Salmonella-induced apoptosis in Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 May 27; 409(1):142-7.
- Zhang C, Li C, Jia S, Yao P, Yang Q, Zhang Y. High-mobility group box 1 inhibition alleviates lupus-like disease in BXS mice. *Scand J Immunol.* 2014 May; 79(5):333-7.
- Luo B, Li B, Wang W, Liu X, Xia Y, Zhang C, Zhang M, Zhang Y, An F. NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model. *PLoS One.* 2014 Aug 19; 9(8):e104771.
- Juan Liu, Yanhong Xu, Zheng Zhang and Jianhe Wei. Hydrogen peroxide promotes programmed cell death and salicylic acid accumulation during the induced production of sesquiterpenes in cultured cell suspensions of *Aquilaria sinensis*. *Functional Plant Biology.* 2014 Nov; 42(4):337-46.
- Wang L, Chen K, Wan X, Wang F, Guo Z, Mo Z. NLRP3 inflammasome activation in mesenchymal stem cells inhibits osteogenic differentiation and enhances adipogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Mar 18; 484(4):871-877.
- Qiu Z, Lei S, Zhao B, Wu Y, Su W, Liu M, Meng Q, Zhou B, Leng Y, Xia ZY. NLRP3 Inflammasome Activation-Mediated Pyroptosis Aggravates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Diabetic Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:9743280.
- Jin Q, Li R, Hu N, Xin T, Zhu P, Hu S, Ma S, Zhu H, Ren J, Zhou H. DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff-required mitochondrial fission and Bnip3-related mitophagy via the JNK pathways. *Redox Biol.* 2018 Apr; 14:576-587.
- Zhai Y, Meng X, Ye T, Xie W, Sun G, Sun X. Inhibiting the NLRP3 Inflammasome Activation with MCC950 Ameliorates Diabetic Encephalopathy in db/db Mice. *Molecules.* 2018 Feb 27; 23(3). pii: E522.
- Fan S, Yuan J, Deng S, Chen Y, Xie B, Wu K, Zhu M, Xu H, Huang Y, Yang J, Zhang Y, Chen J, Zhao M. Activation of Interleukin-1 β Release by the Classical Swine Fever Virus Is Dependent on the NLRP3 Inflammasome, Which Affects Virus Growth in Monocytes. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Jul 2; 8:225.
- Wu D, Han R, Deng S, Liu T, Zhang T, Xie H, Xu Y. Protective Effects of Flagellin A N/C Against Radiation-Induced NLR Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome-Dependent Pyroptosis in Intestinal Cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2018 May 1; 101(1):107-117.
- Zhang X, Luan J, Chen W, Fan J, Nan Y, Wang Y, Liang Y, Meng G, Ju D. Mesoporous silica nanoparticles induced hepatotoxicity via NLRP3 inflammasome activation and caspase-1-dependent pyroptosis. *Nanoscale.* 2018 May 17; 10(19):9141-9152.
- Yuan J, Zhu M, Deng S, Fan S, Xu H, Liao J, Li P, Zheng J, Zhao M, Chen J. Classical swine fever virus induces pyroptosis in the peripheral lymphoid organs of infected pigs. *Virus Res.* 2018 May 2; 250:37-42.
- Li J, Zhou Y, Liu Y, Dai B, Zhang YH, Zhang PF, Shi XL. Sorafenib inhibits caspase-1 expression through suppressing TLR4/stat3/SUMO1 pathway in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2018 Oct 2; 1-8.

14. Xu M, Li F, Wang M, Zhang H, Xu L, Adcock IM, Chung KF, Zhang Y. Protective effects of VGX-1027 in PM2.5-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Pharmacol.* 2019 Jan 5;842:373-383
15. Liu LB, Shen HF, Cha W, Jin ZJ, Xia HJ, Liu JJ, Hu JF. SXBX pill suppresses homocysteine-induced vascular smooth muscle cells dedifferentiation by inhibiting NLRP3 inflammasomes activation via ERK/p38 MAPK pathways. *Am J Transl Res.* 2019 Feb 15;11(2):806-818. eCollection 2019
16. Yang G, Wang J, Luo T, Zhang X. White spot syndrome virus infection activates Caspase 1-mediated cell death in crustacean. *Virology.* 2019 Feb;528:37-47
17. Qiu Z, He Y, Ming H, Lei S, Leng Y, Xia ZY. Lipopolysaccharide (LPS) Aggravates High Glucose- and Hypoxia/Reoxygenation-Induced Injury through Activating ROS-Dependent NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in H9C2 Cardiomyocytes. *J Diabetes Res.* 2019 Feb 17;2019:8151836
18. Chen Y, Ma K. NLR4 inflammasome activation regulated by TNF- α promotes inflammatory responses in nonalcoholic fatty liver disease. *BIOCHEM BIOPH RES CO.* 2019 Apr 9;511(3):524-530
19. Ye P, Wang X, Ge S, Chen W, Wang W, Han X. Long-term cigarette smoking suppresses NLRP3 inflammasome activation in oral mucosal epithelium and attenuates host defense against *Candida albicans* in a rat model. *Biomed Pharmacother.* 2019 May;113:108597
20. Xu M, Zhang Y, Wang M, Zhang H, Chen Y, Adcock IM, Chung KF, Mo J, Zhang Y, Li F. TRPV1 and TRPA1 in Lung Inflammation and Airway Hyperresponsiveness Induced by Fine Particulate Matter (PM2.5). *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Jun 2;2019:7450151
21. Zhang X, Dong P, Xu L, Tian Y, Sun H, Shi H, Duan Z, Chen L, Ren F. The different expression of caspase-1 in HBV-related liver disease and acts as a biomarker for acute-on-chronic liver failure. *BMC Gastroenterol.* 2019 Aug 20;19(1):148
22. Wu Z, Li Y, Liu Q, Liu Y, Chen L, Zhao H, Guo H, Zhu K, Zhou N, Chai TC, Shi B. Pyroptosis engagement and bladder urothelial cell-derived exosomes recruit mast cells and induce barrier dysfunction of bladder urothelium after uropathogenic *E. coli* infection. *AM J PHYSIOL-CELL PH.* 2019 Sep 1;317(3):C544-C555
23. Wang S, Fan J, Mei X, Luan J, Li Y, Zhang X, Chen W, Wang Y, Meng G, Ju D. Interleukin-22 Attenuated Renal Tubular Injury in Aristolochic Acid Nephropathy via Suppressing Activation of NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol.* 2019 Sep 24;10:2277
24. Shen T, Li X, Looor JJ, Zhu Y, Du X, Wang X, Xing D, Shi Z, Fang Z, Li X, Liu G. Hepatic nuclear factor kappa B signaling pathway and NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome is over-activated in ketotic dairy cows. *J Dairy Sci.* 2019 Nov;102(11):10554-10563.
25. Wu G, Zhu Q, Zeng J, Gu X, Miao Y, Xu W, Lv T, Song Y. Extracellular mitochondrial DNA promote NLRP3 inflammasome activation and induce acute lung injury through TLR9 and NF- κ B. *J Thorac Dis.* 2019 Nov;11(11):4816-4828
26. Zhong X, Liu M, Yao W, Du K, He M, Jin X, Jiao L, Ma G, Wei B, Wei M. Epigallocatechin-3-Gallate Attenuates Microglial Inflammation and Neurotoxicity by Suppressing the Activation of Canonical and Noncanonical Inflammasome via TLR4/NF- κ B Pathway. *Mol Nutr Food Res.* 2019 Nov;63(21):e1801230
27. Yu LM, Zhang WH, Han XX, Li YY, Lu Y, Pan J, Mao JQ, Zhu LY, Deng JJ, Huang W, Liu YH. Hypoxia-Induced ROS Contribute to Myoblast Pyroptosis during Obstructive Sleep Apnea via the NF- κ B/HIF-1 α Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Dec 11;2019:4596368
28. Liu Y, He H, Fan L, Yuan J, Huang H, Yang W, Wang L, Mo Z, Wang F. Compound C attenuates NLRP3 inflammasome despite AMPK knockdown in LPS plus palmitate-induced THP-1 cells. *N-S ARCH PHARMACOL.* 2020 Jan;393(1):67-76

Version 2021.09.01.