

Caspase-4活性测定试剂盒

产品货号: BA1979

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-4可以和Apaf-1相互作用, 并参与细胞色素c导致的Caspase-3激活, 也可以和caspase-14相互作用。

试剂盒测定原理基于Caspase-4特异水解其多肽底物Ac-LEVD-pNA, 释放出游离的硝基苯胺pNA, 后者呈黄色在405nm具有最大吸收峰, 采用可见光光度比色法测定。

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。
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)



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

| 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°C 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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{空白管}$ 。 | | | 立即测定405nm下吸光度 |

三、Caspase-4活性计算

1. 标准曲线的建立:

根据标准管的浓度 (x , $\mu\text{mol/L}$) 和 ΔA 标准 (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 ($\mu\text{mol/L}$)。

2. 按酶活性增加百分比计算

$\text{Caspase-4活性增加百分比} = (\text{实验处理组}A_{测定} - A_{空白管}) / (\text{实验对照组}A_{测定} - A_{空白管}) \times 100\%$

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°C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。

$\text{Caspase-4活性 (U/mg prot)} = x \times V_{反总} \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T \times 10^3 = 2x \div C_{pr} \div T$

$V_{反总}$: 反应体系总体积, $0.1\text{mL} = 10^{-4}\text{L}$; $V_{样}$: 加入的样本体积, 0.05mL ; T : 反应时间, h ; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL ; 10^3 : 单位换算系数, $1\mu\text{mol} = 10^3\text{nmol}$ 。

注意事项:

- 由于试剂二中含有还原剂 (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。
- 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。
- 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。
- 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

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com