

Caspase-5 活性检测试剂盒说明书

比色法

货号：AC10608

规格：20T/18S、50T/48S、100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系上海吉至工作人员。

试剂名称/规格	20T	50T	100T	保存条件
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	液体 20 mL×1 瓶	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	液体 120 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 0.25 mL×1 支	液体 0.55 mL×1 支	液体 1.1 mL×1 支	-20°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、标准品：pNA 标准溶液，5 mmol/L。标准溶液在 4°C条件下为浑浊状态，溶解即可变为澄清状态，不影响使用。
- 2、标准品稀释液配制：取 9 mL 试剂一加入 1 mL 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）。

产品说明：

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。

Caspase-5 特异水解其多肽底物 N-acetyl-Trp-Glu-His-Asp-p-nitroanilide (Ac-WEHD-pNA)，释放出游离的硝基苯胺 pNA，后者呈黄色在 405 nm 具有最大吸收峰，采用可见光光度比色法进行测定，吸光度值对应于 Caspase-5 的水解活性。

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、100 μ L 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：

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 μ L 试剂二（若裂解不充分可提高至 150-200 μ L），震荡重悬沉淀，置冰上静置 15 min，4°C，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 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂二），冰浴研磨或充分剪碎，置冰上静置 15 min，4°C，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 5 mmol/L pNA 标准品稀释至 200、100、50、25、12.5、0 μ mol/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 (μ L)	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 $^{\circ}$ 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 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管。			立即测定 405nm 下吸光度

三、Caspase-5 活性计算

1. 标准曲线的建立：

根据标准管的浓度 (x, μ 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 (μ mol/L)。

2. 按酶活性增加百分比计算

$$\text{Caspase-5 活性增加百分比} = (\text{实验处理组 A 测定} - \text{A 空白管}) / (\text{实验对照组 A 测定} - \text{A 空白管}) \times 100\%$$

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 $^{\circ}$ C under saturated substrate concentrations。即一个酶活力单位定义为当底物饱和时，在 37 $^{\circ}$ 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本中含有多少个酶活力单位的 caspase 酶活性。

$$\text{Caspase-5 活性 (U/mg prot)} = x \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 = 2x \div \text{Cpr} \div T$$

V 反总：反应体系总体积，0.1mL=10 $^{-4}$ L；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；10 3 ：单位换算系数，1 μ mol=10 3 nmol。

注意事项：

- 1、由于试剂一中含有还原剂 (DTT)，建议将样本用水稀释 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 $^{\circ}$ 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。

参考文献：

1. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 1997, 326: 1-16.
2. Janicke R U, Sprengart M L, Wati M R, et al. Emerging role of caspase-3 in apoptosis[J]. *Cell Death and Differentiation*, 1999, 6:99-104.

相关系列产品：

- AC10604 Caspase-1 活性检测试剂盒
- AC10605 Caspase-2 活性检测试剂盒
- AC10606 Caspase-3 活性测定试剂盒
- AC10607 Caspase-4 活性检测试剂盒
- AC10609 Caspase-6 活性检测试剂盒
- AC10610 Caspase-8 活性检测试剂盒
- AC10611 Caspase-9 活性检测试剂盒