

Caspase-5 活性检测试剂盒说明书

比色法

货号：BC3850

规格：20T、50T、100T

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	20T 规格	50T 规格	100T 规格	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	-20℃保存
试剂二	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	液体 120 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 0.25 mL×1 支	液体 0.55 mL×1 支	液体 0.55 mL×2 支	-20℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	-20℃保存

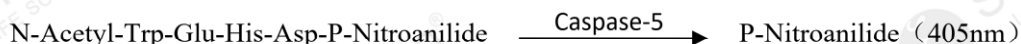
溶液的配制：

- 1、试剂一：分装-20℃保存。
- 2、试剂二：分装-20℃保存。
- 3、标准品：pNA 标准溶液，5 mmol/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 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、100μL 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，离心后弃上清；按照细胞数量（约 10^6 个）加 100μL 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 15 min，15000g 4℃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, 分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释: 将 5 mmol/L pNA 标准品用标准品稀释液稀释至 200、100、50、25、12.5、0μmol/L 的标准溶液备用。
- 3、标准溶液稀释可参考下表:

序号	稀释前浓度 (μmol/L)	标准溶液体积 (μL)	标准品稀释液体积 (μL)	稀释后浓度 (μmol/L)
1	5000	40	960	200
2	200	500	500	100
3	100	500	500	50
4	50	500	500	25
5	25	500	500	12.5
6	0	0	500	0

备注: 下述实验中每个标准管需 100μL 标准溶液。

- 4、在 96 孔板/EP 管中按下表步骤加样:

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 ΔA 测定 = A 测定管 - A 空白管。			立即测定 405nm 下吸光度。标准曲线只需做 1-2 次。

三、Caspase-5 活性计算

1. 标准曲线的绘制:

根据标准管的浓度 (x, μmol/L) 和 ΔA 标准 (y, 减去浓度为 0 的标准管吸光值) 做标准方程。将 ΔA 测定代入标准方程得到 x (μmol/L)。

2. 按酶活性增加百分比计算

Caspase-5 活性增加百分比 = (实验处理组 A 测定 - A 空白管) / (实验对照组 A 测定 - A 空白管) × 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本中含有多少个酶活力单位的 caspase 酶活性。



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

V 反总: 反应体系总体积, 0.1mL=10⁻⁴L; 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; 10³: 单位换算系数, 1μmol=10³nmol。

注意事项:

- 1、由于试剂二中含有还原剂 (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°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:

BC3810 Caspase-1 活性检测试剂盒
BC3820 Caspase-2 活性检测试剂盒
BC3830 Caspase-3 活性检测试剂盒
BC3840 Caspase-4 活性检测试剂盒
BC3860 Caspase-6 活性检测试剂盒
BC3880 Caspase-8 活性检测试剂盒
BC3890 Caspase-9 活性检测试剂盒

