

# Caspase-6 活性检测试剂盒

中文名称：**Caspase-6 活性检测试剂盒**

英文名称：Caspase-6Activity Assay Kit

储存条件：6个月

产品包装：盒装

检测方法：比色法

有效期：-20°C

产品规格：20T、50T、100T

产品组成：

试剂名称/规格	20T	50T	100T	保存条件
试剂一	液体 20mL×1 瓶	液体 20 mL×1 瓶	液体 25 mL×1 瓶	-20°C保存
试剂二	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	液体 120mL×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 0.25L×1 支	液体 0.55mL×1 支	液体 0.55mL×2 支	-20°C保存
标准品	液体 1mL×1 支	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：分装-20°C保存。
- 2、试剂二：分装-20°C保存。
- 3、标准液：pNA 标准溶液，5mmol/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。
- 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-6 也称 Mch-2, 其前体蛋白被 granzyme B 剪切后形成活化的 caspase-6 二聚体, 可诱导细胞凋亡。

Caspase-6 可剪切凋亡的关键调节蛋白 PARP, 剪切核膜上关键蛋白 LaminA, 其对于 LaminA 的识别位点是 VEID。

本试剂盒测定原理基于 Caspase-6 特异水解其多肽底物 Ac-VEID-pNA

(N-acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-p-nitroanilide), 释放出游离的硝基苯胺 pNA, 后者呈黄色在 405 nm 具有大吸收峰, 采用可见光光度比色法测定。其吸光度值对应于 Caspase-6 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 $\mu$ 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。

**一、样本处理 (可适当调整待测样本量)**

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  $\mu$ L 试剂二 (若裂解不充分可提高至 150-200  $\mu$ L), 震荡重悬沉淀, 置冰上静置 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 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,  $4^{\circ}\text{C}$ , 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 $\mu$ 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( $\mu$ 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 $\Delta A$ 测定=A 测定管-A 空白管。			立即测定 405nm 下吸光度

### 三、Caspase-6 活性计算

#### 1. 标准曲线的建立:

根据标准管的浓度 (x,  $\mu$ mol/L) 和  $\Delta A$  标准 (y, 减去浓度为 0 的空白管) 做标准方程。将  $\Delta A$  测定代入标准方程得到 x( $\mu$ mol/L)。

#### 2. 按酶活性增加百分比计算

Caspase-6 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)  $\times$  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°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。

$$\text{Caspase-6 活性 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 = 2x \div \text{Cpr} \div T$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.1mL=10<sup>-4</sup>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<sup>3</sup>: 单位换算系数, 1μmol = 10<sup>3</sup>nmol。

#### 注意事项:

- 1、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。
- 2、Caspase 活性测定值低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。