

中文说明书

Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay

适用产品目录号：G9951、G9952 和 G9953



Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱: chinatechserv@promega.com

1. 产品描述.....	2
2. 产品组分和储存条件.....	6
3. 试剂制备和储存.....	7
4. Caspase-Glo [®] 1 Inflammasome Assay 操作步骤.....	8
4.A 在培养细胞中测量 Caspase-1 活性的操作步骤.....	8
4.B 在细胞培养基中测量释放的 Caspase-1 活性的操作步骤.....	11
4.C 使用纯化的 Caspase 测量 Caspase-1 活性的操作步骤.....	13
5. 代表性数据.....	15
6. 一般注意事项.....	20
6.A 炎症小体活化的动力学和 Caspase Glo [®] 1 Inflammasome Assay.....	20
6.B Caspase-1 的特异性.....	22
6.C 检测灵敏度.....	24
6.D 温度.....	25
6.E 化学品.....	25
6.F 混匀.....	25
6.G 发光检测仪.....	25
7. 参考文献.....	26
8. 缓冲液和溶液的成分.....	27
9. 相关产品.....	28
10. 内容变更总结.....	30

1. 产品描述

Caspase Glo[®] 1 Inflammasome Assay^(a,b) 是一种均质的基于生物发光反应的检测方法，可用于选择性地测量半胱天冬酶-1 (caspase-1) 活性。Caspase-1 是半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (cysteine aspartic acid-specific protease, caspase, 即半胱天冬酶) 家族的成员之一，也是炎症小体的主要成分之一 (1)。炎症小体是由多种炎症刺激诱导的蛋白复合物。先天免疫细胞对病原体和其他危险信号作出反应，从而形成炎症小体，并将无活性的 Caspase-1 酶原转化为有催化活性的 Caspase-1。Caspase-1 的活化导致：1) 细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的处理和释放；以及 2) 细胞焦亡 (pyroptosis)，一种免疫原性形式的细胞死亡 (2-5)。

Caspase Glo[®] 1 Inflammasome Assay 提供一种 caspase-1 特异的底物，即萤光素前体 Z-WEHD- 氨基萤光素，以及为 caspase-1 活性和萤光素酶活性优化的裂解试剂。只需要一次简单的添加该试剂的操作，就可以裂解细胞，使 caspase-1 剪切特异性底物，同时利用一种专有的耐热重组萤光素酶 (即 Ultra-Glo[™] Recombinant Luciferase) 与底物反应产生光信号 (如图 1 所示)。耦合酶系统在底物的半胱天冬酶剪切和氨基萤光素的萤光素酶转化之间达到一个稳定的状态。这些同时发生的反应产生一个稳定的发光信号，并且该信号与半胱天冬酶 (caspase) 活性成正比 (参见图 2)。在该试剂中加入蛋白酶体抑制剂，即 MG-132，可消除由非特异性蛋白酶体介导的底物剪切，从而实现了对 caspase-1 活性的灵敏检测。

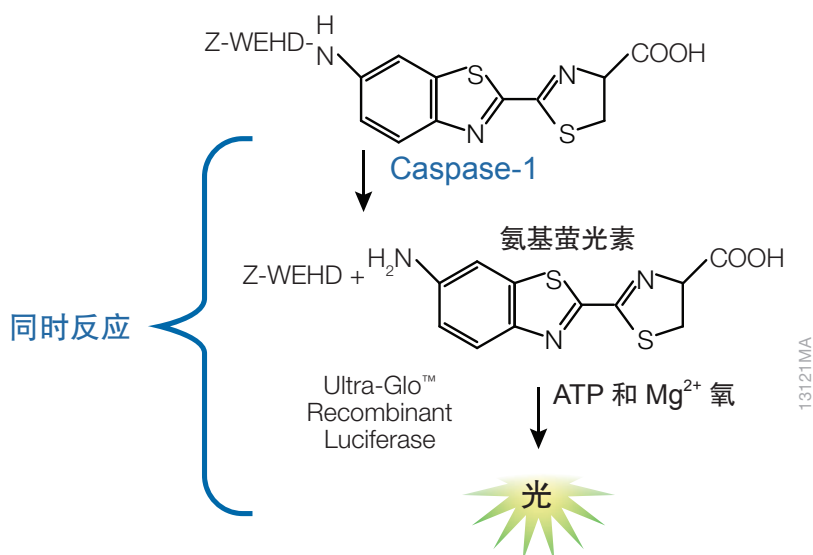


图 1. Caspase Glo[®] 1 Inflammasome Assay 的化学反应过程。 Z-WEHD Substrate (即 Z-WEHD- 氨基萤光素) 发生半胱天冬酶 (caspase) 剪切，并释放萤光素酶底物 (即氨基萤光素)，从而导致萤光素酶反应和光产生。

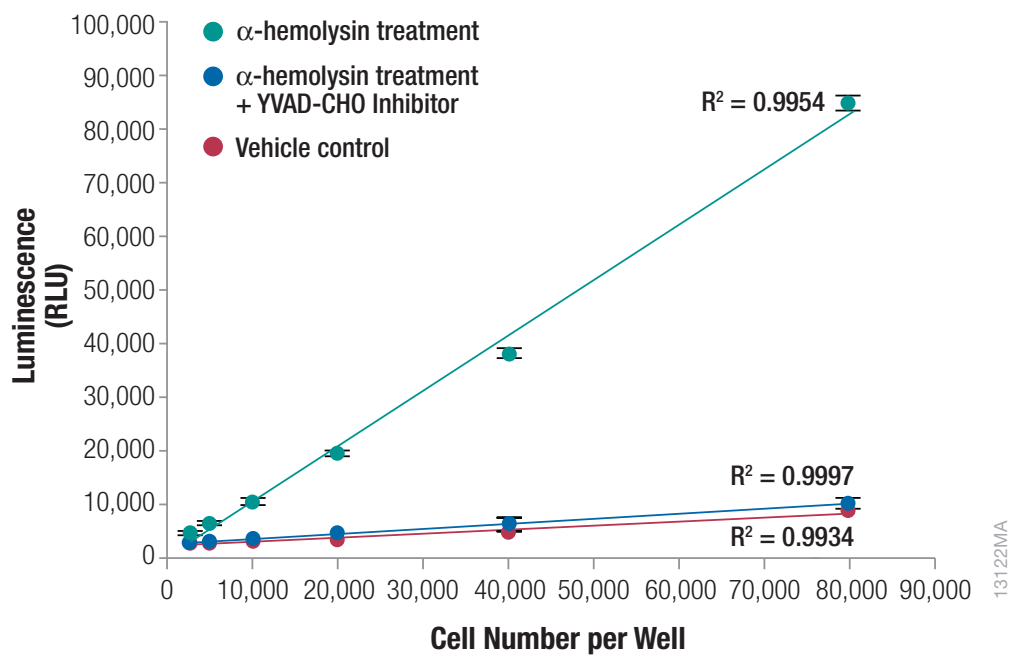


图 2. Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay 具有线性。 THP-1 细胞培养在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中，置于含有 5% CO₂ 的 37°C 培养箱中在 96 孔板中滴定该细胞，使用 α - 溶血素进行处理（2.0 μg/ml，2.5 小时），之后添加 Caspase-Glo® 1 Reagent 或 Caspase-Glo® 1 YVAD-CHO Reagent。在 GloMax® Multi+ Detection System 上记录发光信号。

Caspase Glo® 1 Inflammasome Assay 是为在 96 和 384 孔板中使用而设计的，这使该检测系统成为对 caspase 活性或炎症小体活化进行自动化高通量筛选的理想方法。该检测无需清洗细胞、去除培养基和重复的移液步骤（参见图 3）。这款新开发的 caspase-1 检测系统可以更加快捷有效地评估炎症小体的活化，并实现对炎症小体调节剂的高通量筛选。

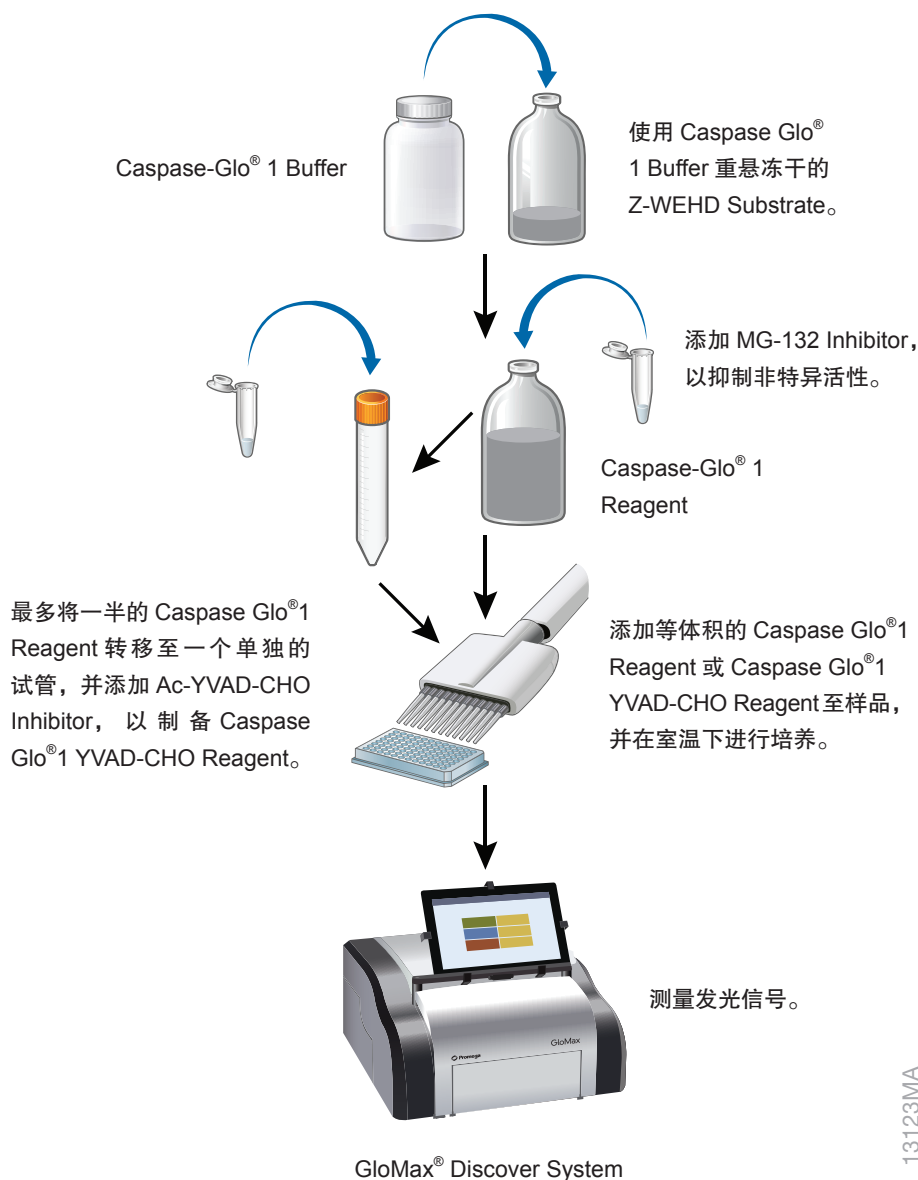


图 3. Caspase Glo® 1 Inflammasome Assay 基于细胞的操作步骤的示意图。

为了验证 caspase-1 的特异性, Caspase Glo® 1 Assay 含有一种 caspase-1 选择性抑制剂, Ac-YVAD-CHO (6)。该抑制剂可抑制 99% 的 caspase-1 活性, 但却不能显著地抑制交叉反应的半胱天冬酶 (参见图 4)。在含有或不含 Ac-YVAD-CHO 的平行孔中进行检测, 可特异地测量 caspase-1 的活性。有关检测特异性的更多信息参见 6.B。

Caspase Glo® 1 Assay 可用于直接在细胞培养物中测量 caspase-1 活性, 也可用于测量培养基中释放的 caspase-1 活性。检测培养基中释放的 caspase-1 活性时不会破坏细胞, 这使该生物样品仍可用于其他检测。Caspase Glo® 1 Assay 也可用于监测 caspase-1 活性对多种炎症小体诱导剂的反应。代表性数据参见 7.B。

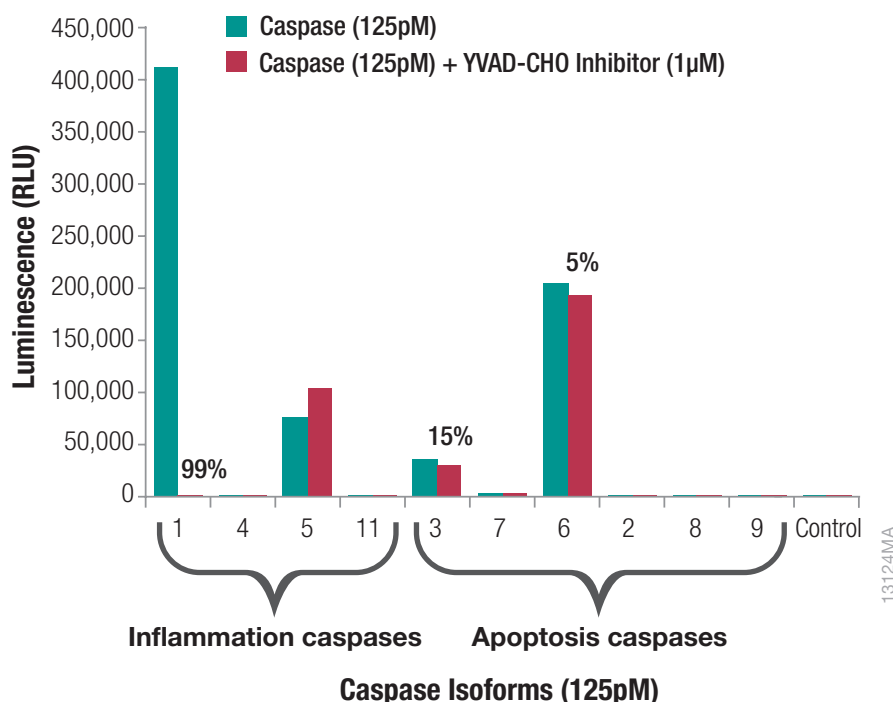


图 4.Z-WEHD- 氨基荧光素底物和 Ac-YVAD-CHO Inhibitor 的选择性。在存在或不存在终浓度为 1 μM Ac-YVAD-CHO Inhibitor 的情况下，检测十种 125 pM caspase。caspase-11 是唯一的小鼠半胱天冬酶；其他的则都是人类半胱天冬酶。caspase-8 也是一种非典型的炎症半胱天冬酶。百分比表示的是 Ac-YVAD-CHO Inhibitor 的抑制量。

Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay 的优点包括：

方法简单：该检测可直接在多孔板上培养的细胞或细胞培养基中测量 caspase-1 活性，从而无需裂解物制备或多次移液步骤。这种均质操作方法使该检测能够在 96 和 384 孔板中实现自动化。

特异性检测 caspase-1：通过 Caspase-Glo® 1 Reagent 中的选择性 caspase-1 底物 Z-WEHD- 氨基荧光素，和 MG-132 Inhibitor，该检测可在多孔板上的细胞或培养基中直接进行，检测 caspase-1 活性。通过添加 Caspase Glo® 1 YVAD-CHO Reagent 至平行孔，可验证此活性为 caspase-1 的特异活性（参见 6.B）。

速度：该检测无需样品制备或处理。仅需添加 Caspase Glo® 1 Reagent 至各孔，该检测可在仅一小时之后测量细胞和细胞培养基中的发光信号。与蛋白印迹分析和 ELISA 相比，该检测所需的时间和工作均更少。

准确度：Caspase Glo® 1 Assay 仅测量具有催化活性的 caspase-1，从而可获得酶功能的精确时程（参见 6.A）。蛋白印迹分析和 ELISA 则不一定监测到活性酶。

灵敏度更高：Caspase Glo® 1 Assay 可提供测量 caspase-1 活性所需的灵敏度（参见 6.B）。

灵活的检测板选择：只需添加等体积的试剂至样品孔中的细胞培养基，可使其轻易地缩放到不同的多孔板中。

批量处理：caspase-1 的发光信号在 Caspase Glo® 1 Reagent 中保持稳定（半衰期大于三小时），使孔板读取时间可以长达几个小时。该检测无需使用带有自动试剂进样器的发光检测仪。

多重检测：该检测可在细胞培养基中监测 caspase-1 活性，从而保存生物样品，以供其他检测使用。此外，该检测也可使用兼容的检测系统（如 CellTox™ Green Cytotoxicity Assay），以进行同孔多重检测。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 1 Assay	10 ml	G9951

该系统含有足以在 96 孔板中进行 100 次 100 µl 检测或在 384 孔板中进行 400 次 25 µl 检测的试剂。包括：

- 1 × 10 ml Caspase-Glo® 1 Buffer
- 1 瓶 Z-WEHD Substrate (冻干的)
- 2 × 30 µl MG-132 Inhibitor
- 1 × 10 µl Ac-YVAD-CHO Inhibitor

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 1 Assay	5 × 10 ml	G9952

该系统含有足以在 96 孔板中进行 500 次 100 µl 检测或在 384 孔板中进行 2000 次 25 µl 检测的试剂。包括：

- 5 × 10 ml Caspase-Glo® 1 Buffer
- 5 瓶 Z-WEHD Substrate (冻干的)
- 1 × 300 µl MG-132 Inhibitor
- 5 × 10 µl Ac-YVAD-CHO Inhibitor

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 1 Assay	100 ml	G9953

该系统含有足以在 96 孔板中进行 1000 次 100 µl 检测或在 384 孔板中进行 4000 次 25 µl 检测的试剂。包括：

- 1 × 100 ml Caspase-Glo® 1 Buffer
- 1 瓶 Z-WEHD Substrate (冻干的)
- 2 × 300 µl MG-132 Inhibitor
- 1 × 100 µl Ac-YVAD-CHO Inhibitor

储存条件：在 -20 °C 下避光储存 Caspase-Glo® 1 Buffer、Z-WEHD Substrate、MG-132 Inhibitor 和 Ac-YVAD-CHO Inhibitor。Caspase-Glo® 1 Buffer 可以在 4 °C 融化并储存长达三个月或在室温下储存长达四天，而不会导致发光信号丢失。保质期参见产品标签。

3. 试剂制备和储存

在使用当天制备 Caspase Glo® 1 Reagent 和 Caspase Glo® 1 YVAD-CHO Reagent。不建议将这些试剂储存超过一天。如果你并不打算当天用完所有制备好的试剂，那么建议按照以下方法先单独配制和保存重悬的 Z-WEHD 底物，然后在实验当天，再添加 MG-132 Inhibitor 和 Ac-YVAD-CHO Inhibitor 以配制成完整的 Caspase-Glo® 1 Reagent and Caspase-Glo® 1 YVAD-CHO Reagent 用于检测。如果已确认了模型系统的特异性，那么可能无需使用 Caspase Glo® 1 YVAD-CHO Reagent。根据实验需求来调整需要制备试剂的总量。

1. 使用前将 Caspase Glo® 1 Buffer 和 Z-WEHD Substrate 平衡至室温（22–25℃）。
2. 将一个 Caspase Glo® 1 Buffer 瓶中的内容物全部转移到一个含有 Z-WEHD Substrate 的琥珀瓶中，以配制 Z-WEHD Substrate。通过旋转或倒置混匀，直至底物完全溶解。配制好的 Z-WEHD- 氨基荧光素浓度为 40 μM，从而在最终的检测反应中达到终浓度 20 μM，即 caspase-1 的表现 Km 值。
3. 在室温下解冻 MG-132 Inhibitor 和 Ac-YVAD-CHO Inhibitor。

注：对于纯化组分构成的生化酶反应来说，这些抑制剂是不必要的。如果使用重组的 caspase-1 进行分析，那么可以直接使用上述用 Caspase Glo® 1 Buffer 重悬的 Z-WEHD- 氨基荧光素作为检测试剂，不需要添加其他成分。参见 4.C。

4. 添加 60 μl MG-132 Inhibitor 至 10 ml（或添加 600 μl MG-132 Inhibitor 至 100 ml）配制好的 Z-WEHD Substrate，以制备 Caspase-Glo® 1 Reagent。通过旋转或颠倒混匀内容物，直至试剂完全混匀。Caspase-Glo® 1 Reagent 中的 MG-132 Inhibitor 浓度为 120 μM，从而在检测中达到 60 μM 的最终浓度。

注：如果使用 10 ml 的试剂盒（目录号：G9951），那么可添加两个试管中的 MG-132 Inhibitor 至整瓶（10 ml）的配好的 Z-WEHD Substrate。或者，可添加一个试管中（30 μl）的 MG-132 Inhibitor 至半瓶（5 ml）配制好的 Z-WEHD Substrate。如果使用 5 × 10 ml 的试剂盒（目录号：G9952），那么可分别添加 60 μl MG-132 Inhibitor 至每一份 10 ml 配制好的 Z-WEHD Substrate。首次解冻后，MG-132 Inhibitor 可以再耐受 5 次冻融循环，保持活性不变。如果使用 100 ml 的试剂盒（目录号：G9953），那么可添加两个试管中的 MG-132 Inhibitor 至整瓶（100 ml）配制好的 Z-WEHD Substrate，或者，可添加一个试管中（300 μl）的 MG-132 Inhibitor 至半瓶（50 ml）配制好的 Z-WEHD Substrate。

5. 转移多达一半的 Caspase Glo® 1 Reagent 至一个单独的试管，并以 1：1000 的比例添加 Ac-YVAD-CHO Inhibitor（即添加 5 μl Ac-YVAD-CHO Inhibitor 至 5 ml Caspase Glo® 1 Reagent），以制备 Caspase Glo® 1 YVAD-CHO Reagent。通过旋转或颠倒完全混匀试剂。试剂中的 Ac-YVAD-CHO 浓度为 2 μM，检测中的最终浓度则为 1 μM。

注：如果已确认了模型系统的特异性，那么可能无需使用 Caspase Glo® 1 YVAD-CHO Reagent。根据需要调整要制备试剂的总量。

试剂储存：与新制备试剂相比 已配制好的 Z-WEHD Substrate 在 4℃ 下储存长达两天未显示出活性损失。配制好的 Z-WEHD Substrate 在 4℃ 下储存一周产生的发光信号约为新制备试剂的 80%。配制好的 Z-WEHD Substrate 在 -20℃ 下储存一周产生的发光信号约为新制备试剂的 85%。配制好的 Z-WEHD Substrate 在 -20℃ 下储存六周产生的发光信号约为新制备试剂的 80%。含有 MG-132 Inhibitor 的 Caspase-Glo® 1 Reagent 可在 4℃ 或室温下过夜储存，而不会导致活性损失。MG-132 Inhibitor 在经过五次额外的冻融循环后可保持稳定，但可能对长时间光照敏感，建议避光保存。Ac-YVAD-CHO Inhibitor 在经过五次额外的冻融循环后可保持稳定。

4. Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay 操作步骤

在进行 Caspase-Glo® 1 Assay 之前，建议确定您所使用的特定细胞的最佳细胞数量和处理时间。一般来说，以 96 孔板为例，可以用每孔 40000-60000 个细胞作为初始条件。

4.A. 在培养细胞中测量 caspase-1 活性的操作步骤

此操作步骤为使用 96 孔板的总反应体积为 200 µl 的检测步骤。在 Caspase-Glo® 1 Reagent 和样品的体积比保持为 1: 1 的情况下，该检测也可调整为其他的体积（如在 384 孔板中，样品和 Caspase-Glo® 1 Reagent 的体积均为 25 µl）。

请在可以与发光检测仪兼容的细胞培养级别的多孔板中培养细胞。准备以下反应，以检测细胞培养物中的 caspase-1 活性。“溶媒”（“Vehicle”）是指用于溶解试验化合物或靶蛋白的溶剂。

- 空白反应：无细胞，添加溶媒和细胞培养基
- 阴性对照：细胞培养基中的溶媒处理细胞
- 实验反应：培养基中的实验因素处理细胞（用于测试炎症小体诱导），或添加测试化合物或靶蛋白的已诱导炎症小体产生的细胞（用于检测炎症小体诱导抑制）

空白反应用于测量与细胞培养基和 Caspase-Glo® 1 Reagent 相关的本底发光信号。空白反应的发光值可从阴性对照细胞和实验细胞的发光值中扣除。阴性对照反应对确定细胞培养体系的本底活性具有重要意义。实验反应用于监测 caspase-1 的活化或 caspase-1 的活化抑制。

图 5 显示了两个适用不同用途的孔板布局示例。

用户需自备的材料

（溶液成分参见第 8 部分。）

- 白色，壁不透光的（底部透光或不透光均可）细胞培养级多孔板，与发光检测仪兼容
- 细胞和培养基
- 多通道移液器或自动移液工作站
- 用于混匀多孔板的孔板振荡器（可选）
- 可读取多孔板的发光检测仪

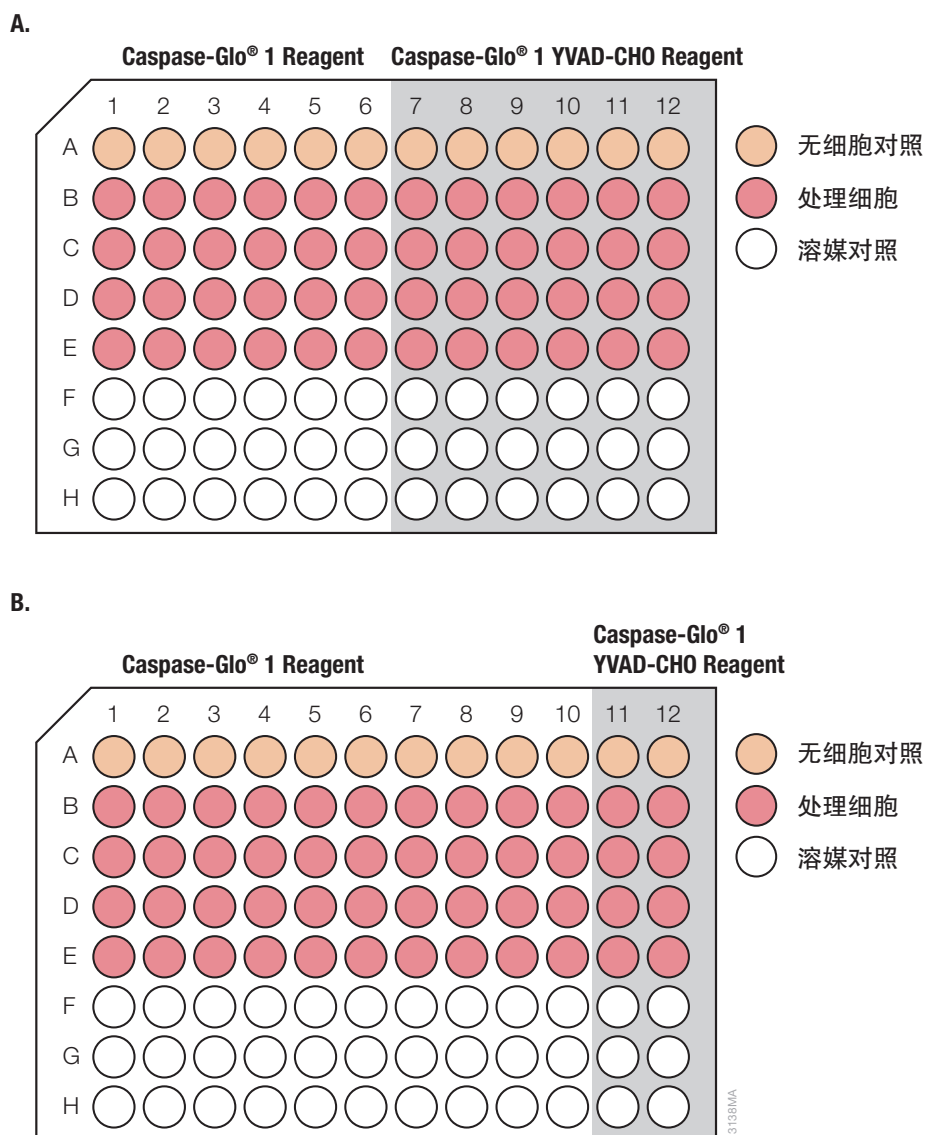


图 5. Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay 孔板布局示例。试板 A。用于测试诱导炎症小体的化合物的孔板布局。
试板 B。用于测试炎症小体抑制剂的孔板布局。

1. 在开始检测之前，制备 Caspase-Glo[®] 1 Reagent 和 Caspase-Glo[®] 1 YVAD-CHO Reagent（如 3 所述）。将这两种试剂平衡至室温。
2. 将含有细胞的 96 孔板从培养箱中取出，并将孔板在室温下平衡五分钟。
3. 96 孔板中应包括含有 100 μ l 培养液的空白反应、阴性对照细胞或处理细胞，向其中一半的重复孔中加入 100 μ l Caspase-Glo[®] 1 Reagent

注：如果反复使用吸液头来分配试剂，避免吸液头接触含有样品的各孔，从而防止交叉污染。

4. 添加 100 μ l Caspase Glo[®] 1 YVAD-CHO Reagent 至另一半重复孔中。使用孔板封膜或盖子盖住孔板。
5. 使用孔板振荡器以 300-500 rpm 轻轻混匀 30 秒。

注：混匀步骤是可选操作。详情参见 6.F。

6. 在室温下孵育至少一小时，以稳定发光信号。
7. 按照发光检测仪制造商提供的操作指南，使用发光检测仪测量发光信号。

注：为了确认 MG-132 抑制和 Ac-YVAD-CHO 抑制的完全性，建议在室温孵育后第 60 分钟、90 分钟和 120 分钟时测量发光信号。可将孔板置于发光检测仪中，并设置为动态检测模式每 30 分钟读取一次。一旦发光信号稳定，在完成 MG-132 抑制和 Ac-YVAD-CHO 抑制之后，信号半衰期大于三小时（参见 6.A 中的图 12）。建议在添加 Caspase-Glo[®] Reagent 之后的三个小时内测量发光信号。对于批量处理实验，这种检测方法的信号稳定性可以满足在 1-3h 内任意时间进行检测。

4.B. 在细胞培养基中测量释放的 caspase-1 活性的操作步骤

此操作步骤为使用 96 孔板的总反应体积为 100 μ l 的检测步骤。在 Caspase-Glo[®] 1 Reagent 和样品的体积比保持为 1:1 的情况下, 该检测也可调整为其他的体积 (如在 384 孔板中, 样品和 Caspase-Glo[®] 1 Reagent 的体积均为 12.5 μ l)。

图 6 显示了示例数据。

请在细胞培养级别的多孔板中培养细胞。如果计划用同一份细胞样品进行多重发光检测, 请确保细胞培养板与发光检测仪兼容。准备以下反应, 以检测细胞培养物中的 caspase-1 活性。“溶媒” (“Vehicle”) 是指用于溶解试验化合物或靶蛋白的溶剂。

- 空白反应: 无细胞, 添加溶媒和细胞培养基
- 阴性对照: 细胞培养基中的溶媒处理细胞
- 实验反应: 培养基中的实验因素处理细胞 (用于测试炎症小体诱导), 或带测试化合物或靶蛋白的已诱导炎症小体产生的细胞 (用于检测炎症小体诱导抑制)

空白反应用于测量与细胞培养基和 Caspase-Glo[®] 1 Reagent 相关的本底发光信号。空白反应的发光值可从阴性对照细胞和实验细胞的发光值中扣除。阴性对照反应对确定细胞培养体系的本底活性具有重要意义。实验反应用于监测 caspase-1 的活化或 caspase-1 的活化抑制。

用户需自备的材料

(溶液成分参见第 8 部分。)

- 白色，壁不透光的（底部透光或不透光均可）细胞培养级多孔板，与发光检测仪兼容
 - 细胞和培养基
 - 多通道移液器或自动移液工作站
 - 用于混合多孔板的孔板振荡器（可选）
 - 可读取多孔板的发光检测仪
1. 在开始检测之前，制备 Caspase-Glo[®] 1 Reagent 和 Caspase-Glo[®] 1 YVAD-CHO Reagent（如 3 所述）。将这两种试剂平衡至室温。
 2. 将含有细胞的 96 孔板从培养箱中取出。
 3. 将 50 μ l 的细胞培养基从实验板的各孔转移至新的白色 96 孔板的相应孔。
 4. 立即添加 50 μ l Caspase Glo[®] 1 Reagent 至含有转移培养基的一半的重复孔中。
注：如果反复使用吸液头来分配试剂，避免吸液头接触含有样品的各孔，从而防止交叉污染。
 5. 添加 50 μ l Caspase-Glo[®] 1 YVAD-CHO Reagent 至含有转移培养基的另一半孔。避免吸液头接触含有样品的各孔，以防止交叉污染。使用孔板封膜或盖子盖住孔板。
 6. 使用孔板振荡器以 300-500 rpm 轻轻混匀 30 秒。
注：混匀步骤是可选操作。详情参见 6.F。
 7. 在室温下培养至少一小时，以稳定发光信号。
 8. 按照发光检测仪制造商提供的操作指南，使用发光检测仪测量发光信号。
注：为了确认 MG-132 抑制和 Ac-YVAD-CHO 抑制的完全性，建议在室温孵育后第 60 分钟、90 分钟和 120 分钟时测量发光信号。可将孔板置于发光检测仪中，并设置为动态检测模式每 30 分钟读取一次。一旦发光信号稳定，在完成 MG-132 抑制和 Ac-YVAD-CHO 抑制之后，信号半衰期大于三小时（参见 6.A 中的图 12）。建议在添加 Caspase-Glo[®] 1 Reagent 之后的三个小时内测量发光信号。

4.C. 使用纯化的 caspase 测量 caspase-1 活性的操作步骤

此操作步骤为使用 96 孔板的总反应体积为 100 μ l 的检测步骤。在配制好的 Z-WEHD Substrate 和样品的体积比保持为 1: 1 的情况下, 该检测也可调整为其他的体积 (如在 384 孔板中, 样品和配制好的 Z-WEHD Substrate 的体积均为 25 μ l)。

在多孔板中准备以下反应, 以检测纯化酶制剂中 caspase-1 的活性或活性抑制。“溶媒” (“Vehicle”) 是指用于溶解试验化合物的溶剂。

- 阴性对照: 酶稀释缓冲液, 和试验化合物或抑制剂的溶媒 (如使用)
- 阳性对照: 溶媒, 酶稀释缓冲液, 和纯化的半胱天冬酶 -1 酶
- 实验反应: 测试化合物, 酶稀释缓冲液, 和纯化的半胱天冬酶 -1 酶

阴性对照用于在存在配制好的 Z-WEHD Substrate 的情况下测量与测试化合物溶媒相关的本底发光信号。阳性对照用于确定使用纯化的半胱天冬酶 -1 酶可获得的最大发光信号。

注:

1. 使用者可能需要根据经验确定最佳的 caspase-1 浓度。
2. 使用相同的酶浓度进行实验和阳性对照反应。
3. 不同的制造商提供的 caspase 特异活性和活性单位定义可能会有很大差异。
4. 市场上有两种形式的重组 caspase-1。一种形式来自于野生型 caspase-1 序列, 另一种形式则含有一个突变, 以尽量减少自体酶解。野生型 caspase-1 具有不稳定性, 在进行酶滴定时, 其发光信号呈现出非线性。突变型 caspase-1 在很宽的酶浓度范围内都能产生线性的发光信号, 但其酶活性具有不稳定性, 半衰期约为 30 分钟。

需用户自备的材料

(溶液成分参见 8。)

- 多孔板，与发光检测仪兼容
 - 多通道移液器或自动移液工作站
 - 用于混合多孔板的孔板振荡器 (可选)
 - 可读取多孔板的发光检测仪
 - 纯化的 caspase-1 酶 (如 ENZO 目录号: BML-SE168-5000 或 ALX-201-056)
 - 一种适用于稀释纯化 caspase-1 酶的酶稀释缓冲液，如 caspase-1 稀释缓冲液 (说明书第 8 部分, Caspase-1 enzyme dilution buffer)
1. 制备重悬 Z-WEHD Substrate (如 3 所述) (纯化的酶活性检测无需 MG-132 Inhibitor 和 YVAD-CHO Inhibitor) 。将该试剂平衡至室温。
 2. 在 96 孔板中制备阴性对照、阳性对照和实验反应 (如上所述) 。确保各孔的最终体积均为 50 μ l。
 3. 添加 50 μ l 配制好的 Z-WEHD Substrate 至各个样品。
注: 如果反复使用吸液头来分配试剂，避免吸液头接触含有样品的各孔，从而防止交叉污染。
 4. 使用孔板振荡器以 300-500 rpm 轻轻混匀 30 秒。
注: 混匀步骤是可选操作。详情参见 6.F。
 5. 室温下孵育 10 分钟。
 6. 按照发光检测仪制造商提供的操作指南，使用发光检测仪测量发光信号。
注: 建议在添加 Caspase-Glo[®] 1 Reagent 之后的 30 分钟内测量发光信号。

5. 代表性数据

Caspase Glo® 1 Assay 可用于直接在细胞培养物中测量 caspase-1 活性，也可用于在培养基中测量释放的 caspase-1 活性（参见图 6）。对培养基中释放的 caspase-1 活性的监测不会破坏细胞，这使该生物样品仍可用于其他多重检测（参见图 7）。

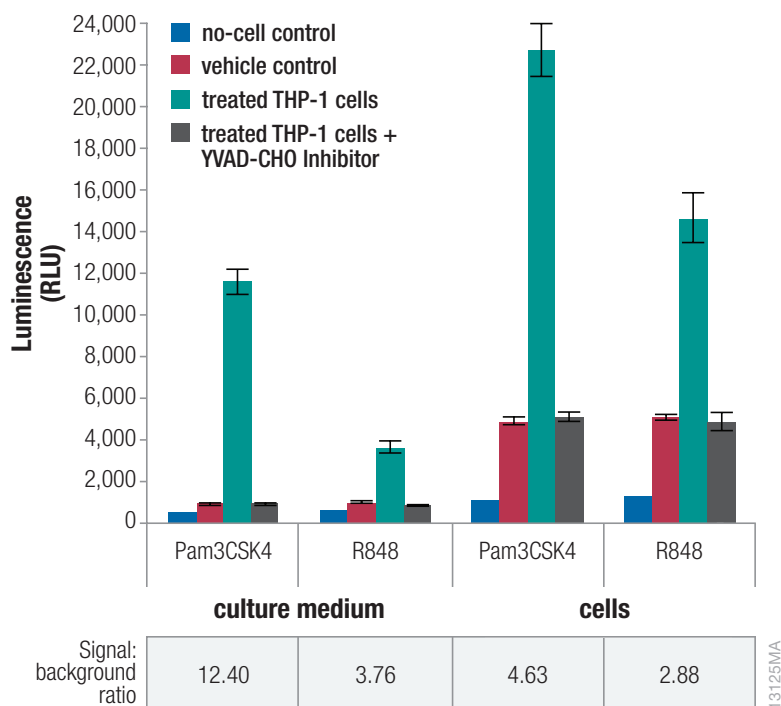


图 6. Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay 可检测培养基中释放的 caspase-1。在含有 5% CO₂ 的 37°C 培养箱中，用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养 THP-1 细胞。然后用 20 nM 佛波醇-12-十四酸酯-13-乙酸酯（丙二醇甲醚醋酸酯，PMA）分化两天，之后用 Pam3CSK4（2 µg/ml）或雷西莫特（R848，20 µM）处理两小时。转移一半培养基（50 µl/孔）至第二个培养板，以 50 µl/孔添加 Caspase Glo® 1 Reagent 或 Caspase Glo® 1 YVAD-CHO Reagent，并按照 GloMax® Multi+ Detection System with Instinct® Software 的技术手册 #TM340 的指示，使用 GloMax® Multi+ Detection System 记录发光信号。对于细胞，直接以 100 µl/孔添加试剂至 100 µl/孔的培养细胞。

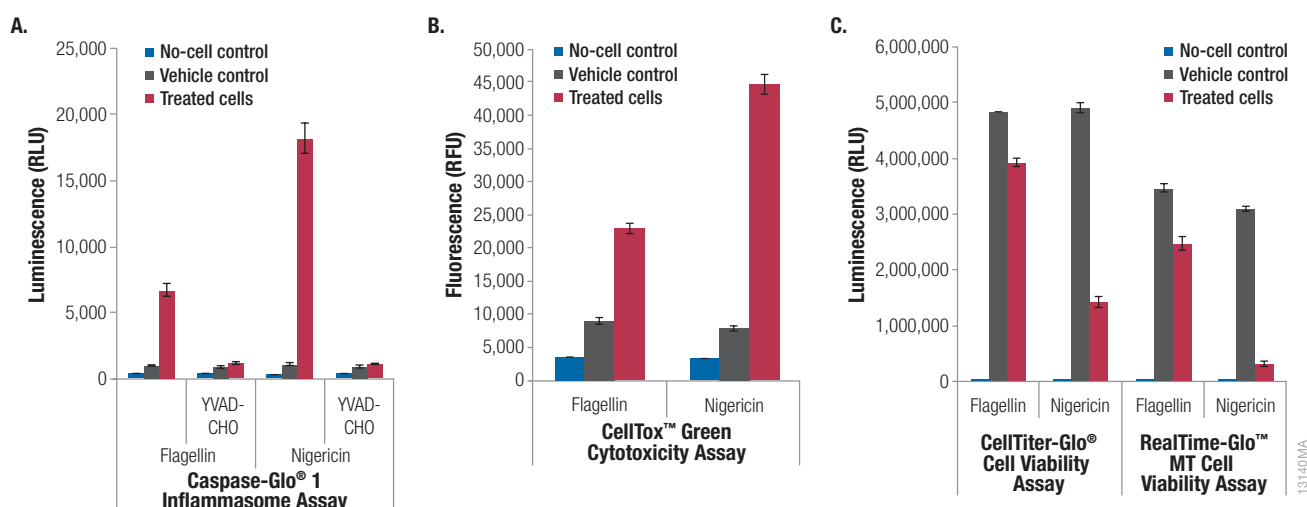


图 7. Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay 与细胞活性和细胞死亡检测进行多重叠加检测。在含有 5% CO₂ 的 37°C 培养箱中，用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养 THP-1 细胞。以 5×10^5 细胞 /ml 添加细胞至 100 μ l 的培养基，在 96 孔板中用丙二醇甲醚醋酸酯分化（PMA，20nM，三天），然后用鞭毛蛋白（flagellin，1 μ g/ml，一小时）或尼日利亚霉素（nigericin，20 μ M，两小时）进行处理。**A.** 转移一半的培养基（50 μ l）至一个单独的孔板，添加 50 μ l Caspase Glo® 1 Reagent 或 Caspase Glo® 1 YVAD-CHO Reagent 至各孔。于 30 分钟之后记录发光信号。然后按照制造商的指示，使用 CellTox™ Green Cytotoxicity Assay、CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 或 RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay 对含有细胞和剩余一半培养基的原始孔板进行检测。**B.** 添加 CellTox™ Green Reagent 至细胞，并于 90 分钟之后记录发光信号。**C.** 使用 CellTiter-Glo® 或 RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay 监测细胞活性。分别于 10 分钟（前者）和 90 分钟（后者）之后记录发光信号。按照 GloMax® Multi+ Detection System with Instinct® Software 的技术手册 #TM340 的指示，使用 GloMax® Multi+ Detection System 记录所有的发光信号和荧光读数。

我们使用该检测系统，以 96 孔或 384 孔板模型，展示了经过尼日利亚霉素、尿酸单钠（MSU）、 α -溶血素、脂多糖（LPS）、雷西莫特（R848）、Pam3CSK4 和鞭毛蛋白诱导的 THP-1 细胞中，caspase-1 活性（参见图 6-8）。该系统还测量了小鼠骨髓来源的巨噬细胞（参见图 9）、人原代单核细胞（参见图 10）和 J774A.1 小鼠巨噬细胞（参见图 11）中的 caspase-1 活性。

注：以下是对本章节所列举实验结果中用到的各个炎症小体诱导剂的简短描述。

葡萄球菌 α -溶血素 (Staphylococcal α -hemolysin)：一种细菌毒素，可激活炎症小体的活性，并且诱导程序性坏死（炎症坏死；7，8）。

脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)：一种 toll 样受体 4 (TLR4) 激动剂，常见于革兰氏阴性菌的外膜，充当内毒素，可引起强烈的免疫反应（9-11）。

雷西莫特 (resiquimod, R848)：一种 TLR7/8 激动剂，可激活炎症小体（12）。

PAM3CSK4：一种合成三酰脂肽，模拟了细菌脂多糖的酰化氨基末端，同时也是一种 TLR2 激动剂，可诱导 caspase-1 的活化（11）。

鞭毛蛋白 (Flagellin)：一种 TLR5 激动剂，可在细胞内激活 NLRC4/NAIP5 炎症小体（13，14）。

尼日利亚霉素 (Nigericin)：一种微生物毒素，充当钾离子载体。细胞内 K^+ 的减少可引起 caspase-1 的活化（15）。

尿酸单钠结晶 (Monosodium urate crystals, MSU)：一种可引起急性炎症的试剂。该晶体可导致溶酶体破裂和 caspase-1 的活化（16，17）。

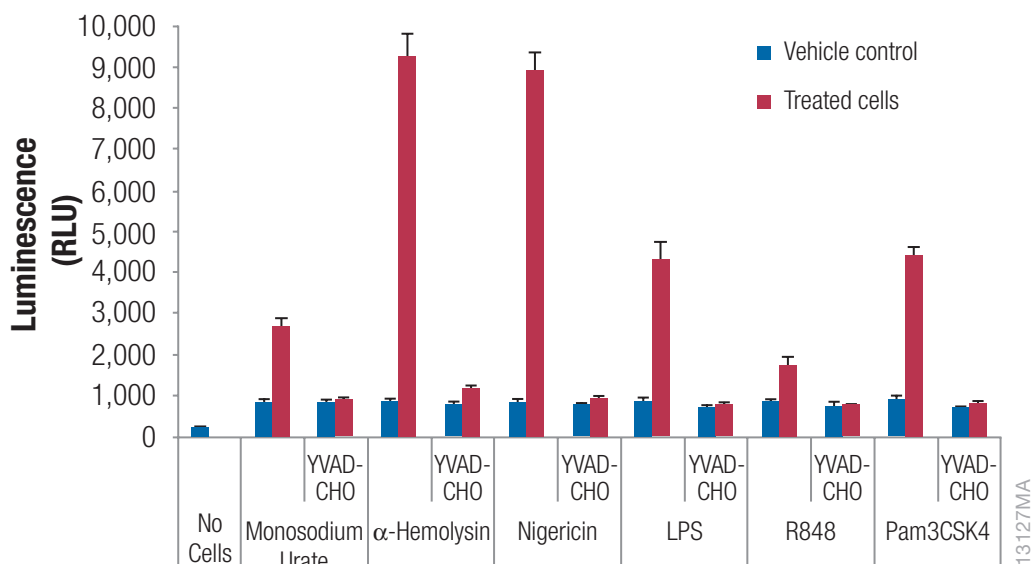


图 8. 384 孔板中的 Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay。在含有 5% CO_2 的 37℃培养箱中，用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养 THP-1 细胞。。将 20 μ l 1.25×10^5 细胞 /ml 的细胞悬液添加至 384 孔板中，用丙二醇甲醚醋酸酯分化（PMA，20 nM，两天），然后用 MSU（200 μ g/ml，四小时）、 α -溶血素（2 μ g/ml，两个半小时）、尼日利亚霉素（20 μ M，两小时）、脂多糖（超纯、1 μ g/ml、两个半小时）、R848（20 μ M，两个半小时）或对应的溶媒进行处理。添加 Caspase Glo[®] 1 Reagent 或 Caspase Glo[®] 1 YVAD-CHO Reagent（20 μ l/ 孔），并于 90 分钟之后使用 GloMax[®] Discover System 测量发光信号。

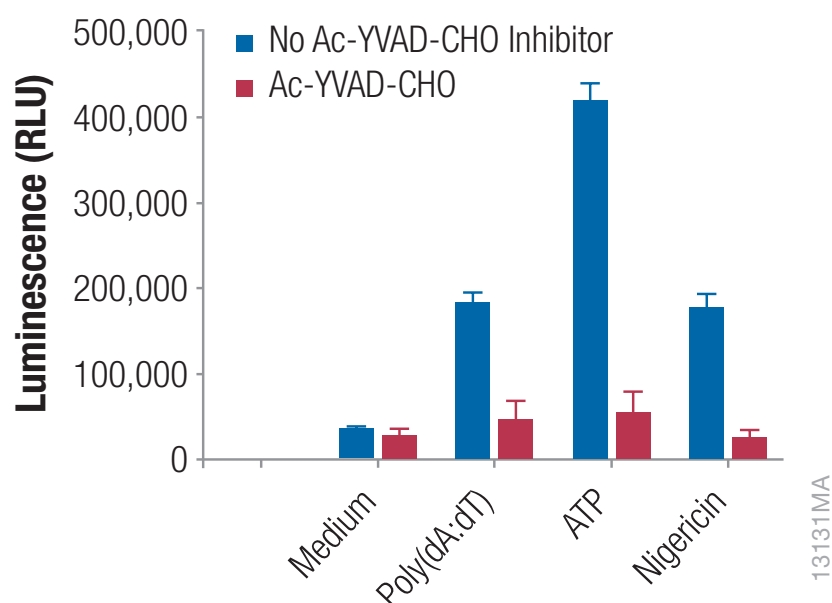


图 9. 使用 Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay 监测小鼠骨髓巨噬细胞培养基中的 caspase-1 活性。在含有 20% L929 上清液的 DMEM 中培养骨髓细胞八天，以产生巨噬细胞。先用 100 ng/ml 脂多糖 (LPS) 处理细胞 3-8 小时，然后用 Poly (dA:dT) (双链 DNA; 1 µg/ml) 刺激细胞七小时，或用 ATP (5 mM) 或尼日利亚霉素 (nigericin, 10 µM) 刺激细胞一小时。转移细胞上清液，添加 Caspase Glo® 1 Reagent 或 Caspase Glo® 1 YVAD-CHO Reagent (50 µl/孔) 至各孔，并在 BioTek Synergy™ 多孔板读数仪上测量发光信号。(图片由康涅狄格大学的 Sivapriya Kailasan Vanaja 和 Vijay Rathinam 博士提供。)

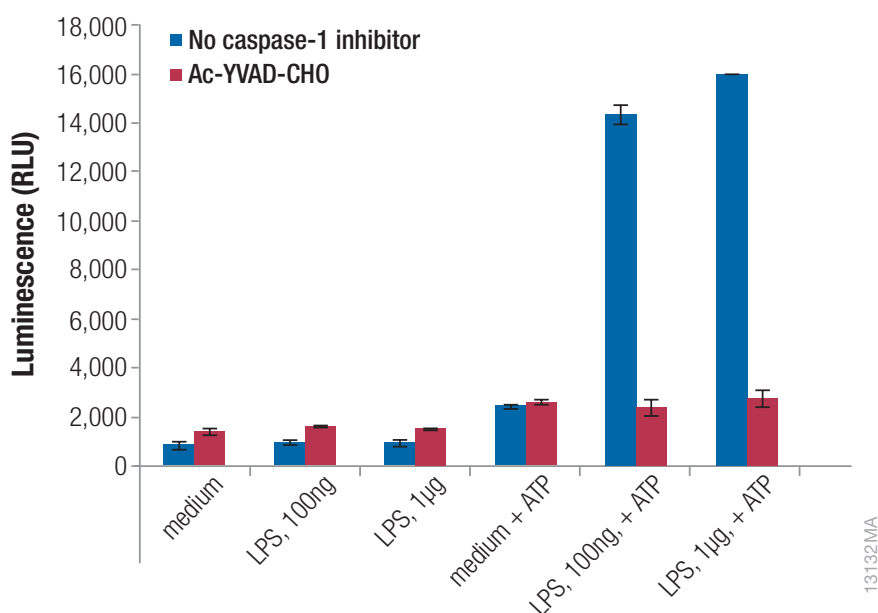


图 10. 使用 Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay 监测外周血单核细胞 (PBMC) 上清液中的 caspase-1 活性。将全血置于离心管中 Lympholyte Human Cell Separation Media (Cedarlane) 的上层, 并以 800 × g 离心 20 分钟。用巴斯德吸管小心地去除白细胞层, 并转移至一个全新的试管中, 管中有包含 10 mM EDTA 和 2% 胎牛血清 (FBS) 的 PBS。用 PBS+EDTA+FBS 清洗细胞两次, 然后用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬细胞至终浓度 1×10^6 细胞/ml。将细胞铺板于 96 孔板, 用或者不用 E. coli 0111:B4 脂多糖 (100 ng/ml 或 1 µg/ml; Sigma-Aldrich) 刺激三小时, 然后用 ATP (5 mM; Bioshop) 刺激 30 分钟。离心孔板以沉淀细胞, 并转移每孔 50 µl 上清液至白色 96 孔板。添加 Caspase-Glo® 1 Reagent 或 Caspase-Glo® 1 YVAD-CHO Reagent 至白色检测板每个样品孔 (50 µl/孔)。于 60 分钟之后记录发光信号。(图片由安大略省金斯顿市皇后大学的 Carlene Petes 和 Katrina Gee 博士提供。)

6. 一般注意事项

6.A. 炎症小体活化的动力学和 Caspase Glo[®] 1 Inflammasome Assay

目前，常用的监测活化的 caspase-1 的方法（如蛋白印迹分析和 ELISA）测量的是经加工的 caspase-1（蛋白印迹分析）和释放的 caspase-1（ELISA），但不一定检测到的就是有活性的 caspase-1。Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay 仅检测有活性的 caspase-1；因此，该技术能够让使用者很好地监测在炎症小体活化之后 caspase-1 的活性。一旦 caspase-1 被激活并从细胞中释放，其活性相当短暂，并且半衰期相对较短（18；参见图 11）。我们已在多种炎症小体诱导剂处理的 THP-1 和 J774A.1 细胞模型中观察到了这个现象。为了能监测到活化的 caspase-1，使用者可能需要优化检测时间。但是，一旦添加能裂解细胞的 Caspase-Glo[®] 1 Reagent 至培养细胞或待测培养基，由炎症小体介导的活化的 caspase-1 就会稳定（与重组 caspase-1 相比），从而在 MG-132 完成对蛋白酶体活性抑制之后产生连续稳定的发光信号（参见图 12）。来自细胞的 caspase-1 在 Caspase Glo[®] 1 Reagent 中能保持活性，并且半衰期大于三小时，这为发光检测仪的数据读取提供了灵活性。

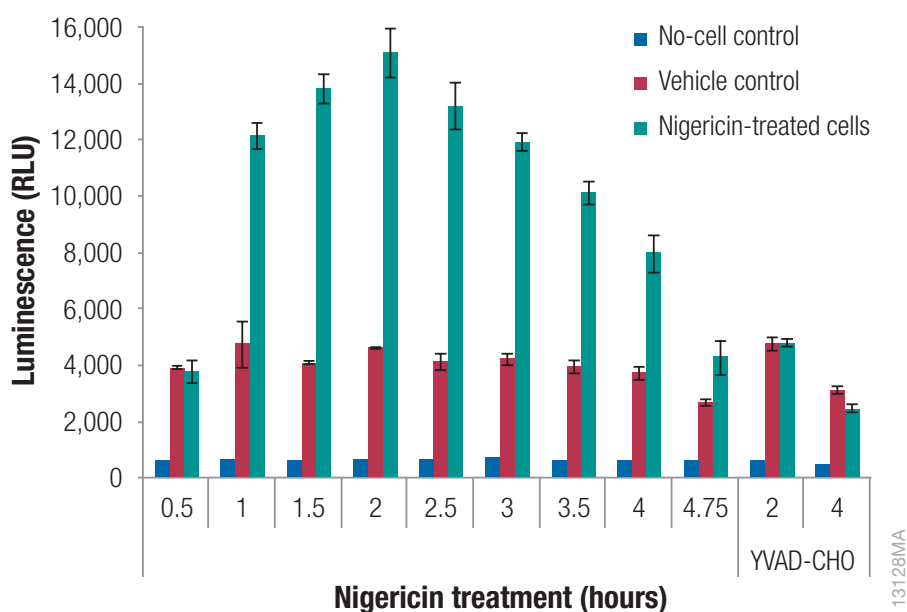


图 11. caspase-1 活化的时程。在含有 5% CO₂ 的 37°C 培养箱中，用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 J774A.1 细胞（50000 细胞/孔）。将 100 μl 浓度为 4 × 10⁵ 细胞/ml 的细胞悬液添加至 96 孔板中，并进行过夜培养。于次日用 LPS（500 ng/ml）处理细胞约四小时，然后用尼日利亚霉素（nigericin，20 μM）或溶媒按照规定的不同时间处理细胞。添加 Caspase-Glo[®] 1 Reagent 或 Caspase-Glo[®] 1 YVAD-CHO Reagent 至细胞（100 μl/孔）。于两小时之后使用 GloMax[®] Multi+ Detection System 测量发光信号。

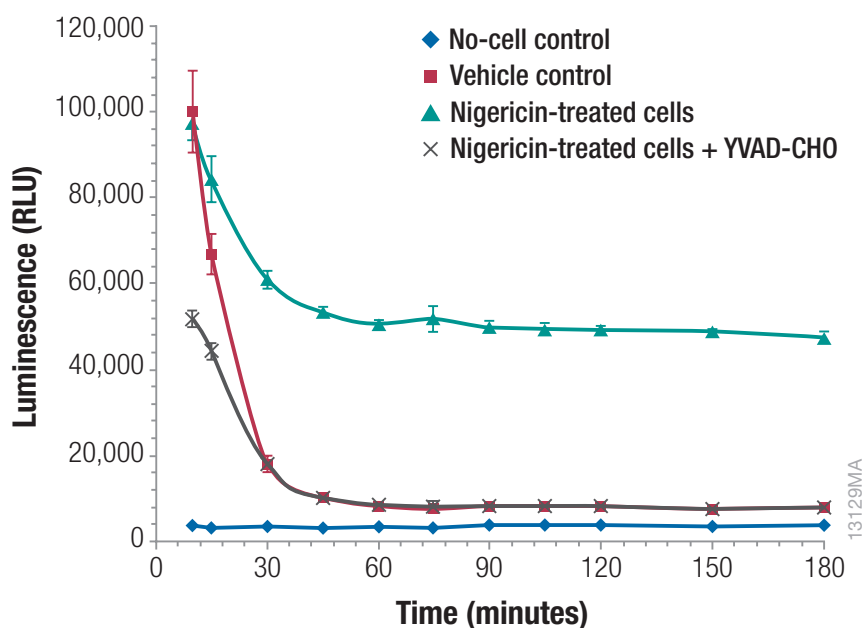
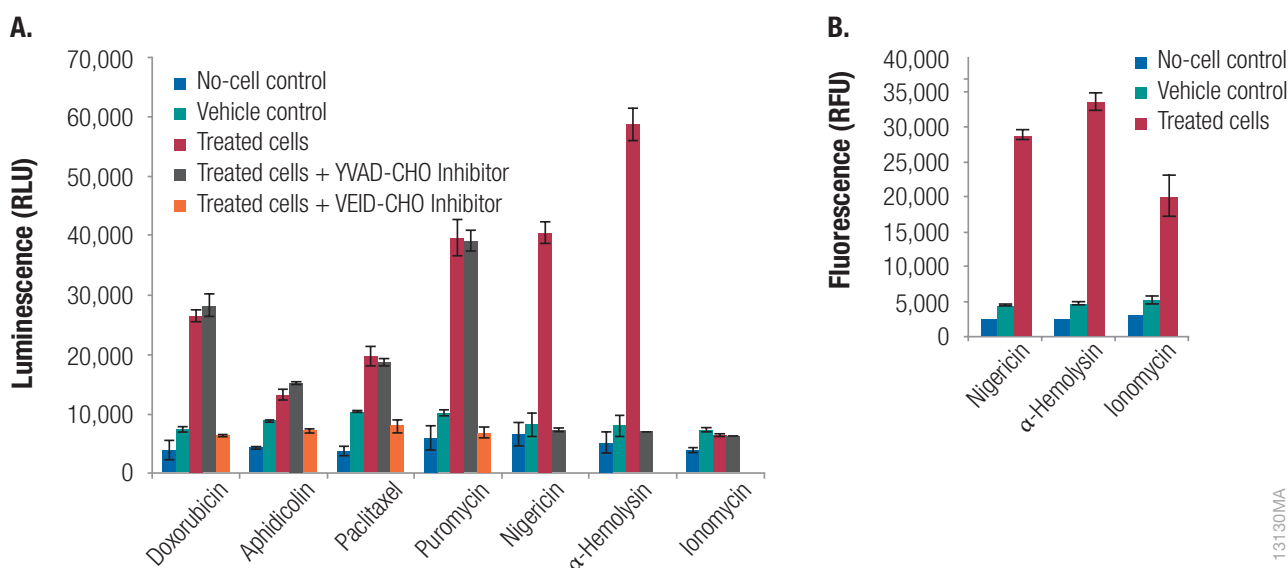


图 12. Caspase-Glo® 1 Assay 发光信号的动力学。在含有 5% CO₂ 的 37℃培养箱中，用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养 THP-1 细胞。将 100 μl 浓度为 5×10^5 细胞 /ml 的细胞悬液添加至 96 孔板中并用尼日利亚霉素 (nigericin, 20 μM, 2 小时) 进行处理。添加 Caspase Glo® 1 Reagent 或 Caspase Glo® 1 YVAD-CHO Reagent 至各孔，并按照规定的时间点用 GloMax® -Multi+ Detection System 记录发光信号。红线表示蛋白酶体抑制的动力学，灰线表示 caspase-1 抑制的动力学，绿线则表示一旦蛋白酶体抑制完成，Caspase-Glo® 1 信号将稳定。

6.B. caspase-1 的特异性

Caspase 四肽底物在不同的 Caspase 中表现出显著的交叉反应 (19)。在细胞中, 由于其丰度和强烈的催化活性, 凋亡相关的 Caspase 特别容易发生交叉反应 (20)。在等摩尔浓度下, 用十种重组 Caspase 测试 Z-WEHD- 氨基荧光素底物特异性。结果显示, 该底物与 caspase-5、3 和 6 可发生交叉反应, 但未与 caspase-2、4、7、8、9 或 11 发生交叉反应 (参见图 4)。为了检测交叉反应, Caspase-Glo® 1 Assay 中包括了 caspase-1 的选择性抑制剂, 即 Ac-YVAD-CHO。在 1 μ M 的最终浓度下, 该抑制剂可抑制 99% 的 caspase-1 活性, 但不能显著抑制交叉反应的其他 caspase (参见图 4)。caspase-1 的特异性通过在平行孔中进行的两组检测得以证实: 一组使用了 Ac-YVAD-CHO Inhibitor, 另一组则未使用。这要求制备两种 Caspase-Glo® 1 Reagent: 一种含有 2 μ M 浓度 (1 μ M 的最终浓度) 的 Ac-YVAD-CHO, 另一种则不含 (如 3 所述)。Ac-YVAD-CHO 对发光信号的抑制证实了该信号由 caspase-1 产生; 相反, 缺乏抑制则表明发光不由 caspase-1 活性产生 (参见图 4 和 13)。caspase-1 抑制在添加 Caspase Glo® 1 YVAD-CHO Reagent 之后的约 60 分钟完成。



13130MA

图 13. Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay 区分炎症小体活化、凋亡和坏死。 **A.** 在含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中，用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养 THP-1 细胞。然后用凋亡诱导剂阿霉素（doxorubicin）、阿非迪霉素（aphidicolin）、紫杉醇（paclitaxel）和嘌呤霉素（puromycin）处理 18 小时。另外一块板上的 THP-1 细胞用炎症小体诱导剂尼日利亚霉素（nigericin, 20 μM）和 α-溶血素（α-hemolysin, 2 μg/ml）处理两小时，或用离子霉素（ionomycin, 100 μM）处理两小时，以诱导坏死。添加 YVAD-CHO 或 VEID-CHO 抑制剂到 Caspase-Glo® 1 Reagent 至浓度为 2 μM，以获得 1 μM 的最终反应浓度。于 60 分钟之后使用 GloMax® Multi+ Detection System 测量发光信号。YVAD-CHO 的抑制表明，酶活性可归因于 caspase-1，而 VEID-CHO 的抑制则表明，凋亡的 caspase 酶活性不是由 caspase-1 产生。**B.** 同时添加 CellTox™ Green Cytotoxicity Reagent 和尼日利亚霉素、α-溶血素和离子霉素，并在添加 Caspase Glo® 1 Reagent 之前监测荧光信号。处理后荧光信号的增强证实了膜通透性增加和细胞死亡。

Caspase Glo® 1 Assay 特异性已在炎症小体活化、凋亡和坏死的细胞培养模型中得以验证。培养细胞中炎症小体活化产生的检测发光信号被 Ac-YVAD-CHO 完全抑制。培养细胞中凋亡产生的发光信号不受 Ac-YVAD-CHO 的抑制。坏死则不会产生发光信号（参见图 13）。

在细胞培养系统中，凋亡细胞会由于 caspase-3 和 6 的活性而产生发光信号。虽然 Z-WEHD-氨基荧光素是凋亡 caspase 的相对较差的底物（19, 21），但由于其足够的丰度和活性，caspase-3 和 6 均可被该分析系统检测到（20；参见图 4 和 13）。由于活性太低，其他半胱天冬酶则无法在细胞培养物中被检测到。在建议的最终浓度（1 μM）下，Ac-YVAD-CHO 可抑制 caspase-1 的活性，但不影响 caspase-3 或 6 的活性（6；参见图 13）。因此，如果 1 μM Ac-YVAD-CHO 不抑制发光信号，则该发光信号不能被归因于 caspase-1。

caspase-1 选择性抑制剂，即 Ac-YVAD-CHO，其浓度已经仔细校准，以区分 caspase-1 的炎症小体活性和 Caspase Glo® 1 Reagent 中的其他交叉反应的凋亡 caspase。不要使用更高浓度的抑制剂或直接添加抑制剂至细胞去抑制炎症小体的活化。

6.C 检测灵敏度

发光底物通常比类似的荧光底物更加灵敏 (22-24)，这也适用于 caspase-1 底物 (参见图 14)。WEHD 是 caspase-1 最理想且最灵敏的四肽底物 (21, 25)。为了确定细胞中的检测灵敏度，我们在 96 孔板中滴定了用 α -溶血素处理的 THP-1 细胞，并用 10000-80000 细胞 / 孔获得了清晰发光信号 (参见图 2)。我们通常用 50000 THP-1 细胞 / 孔来获取稳定的发光信号。我们还用每孔 50000 个 J774.1 细胞获得了稳定的发光信号 (参见图 11)。此方法具有高灵敏度，可在 384 孔板上 25 μ l 的培养基中，以 12500 细胞 / 孔，在用多种炎症小体诱导剂处理的 THP-1 细胞中，清晰地检测到 caspase-1 活性 (参见图 8)。通过比较使用 Caspase-Glo[®] 3/7 Assay 监测的 caspase-3/7 活性和使用 Caspase-Glo[®] 1 Assay 监测的 caspase-1 活性，我们发现 caspase-1 活性低一个数量级，并且明显更加短暂。因此，Caspase-Glo[®] 1 发光 (相对光单位, RLU) 低于其他 Caspase-Glo[®] Assay 的发光，但这种差异是由于炎症小体生物学特性和 caspase-1 活化的短暂性而非检测试剂性能所导致的。

细胞是否健康会影响检测灵敏度。在具有高凋亡活性的细胞培养模型中，总发光信号中可以被 Ac-YVAD-CHO 抑制的部分将减少 (参见 6.B)。重要的是，在测试炎症小体活性之前，要尽可能地确保细胞健康。可以通过转移细胞培养上清到一个新的孔板，检测释放到上清中的 caspase-1，而不是直接监测培养细胞中的 caspase-1，通过降低背景来改善信号，从而提高灵敏度 (参见图 6)。当监测培养基中释放的 caspase-1 时，未处理的对照的本底信号通常较低。

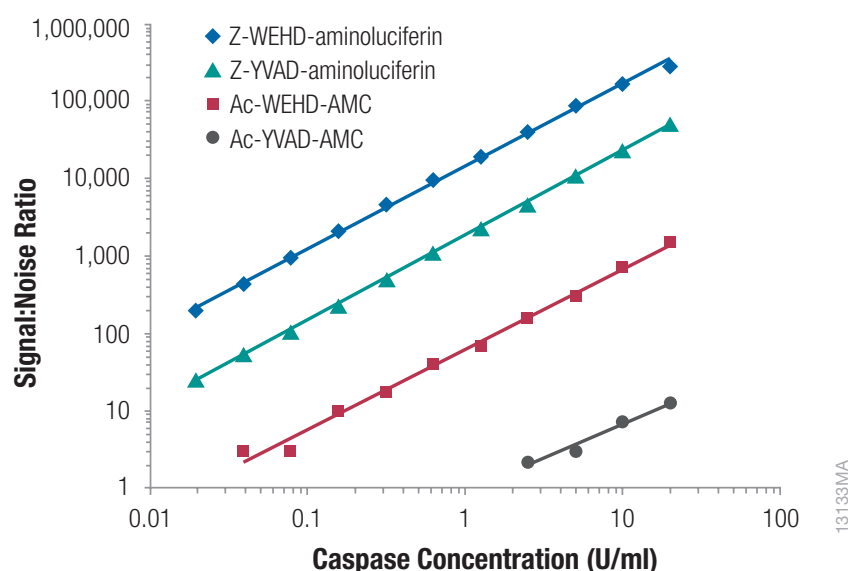


图 14. 发光检测和荧光检测的比较。用含有 1% Prionex[®] 和 2 mM DTT 的 10 mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 在白色 96 孔板中连续稀释 caspase-1 至规定的浓度。对于发光检测，用 Caspase Glo[®] 1 Buffer 重悬 Luciferin Detection Reagent，并将 Z-WEHD-氨基荧光素或 Z-YVAD-氨基荧光素添加至终浓度为 40 μ M。以 1:1 的体积比 (v/v) 添加该底物试剂，并于 15 分钟之后用 GloMax[®]-Multi+ Detection System 记录发光信号。对于荧光检测，在 0.1% Prionex[®] 的 100 mM HEPES (pH 7.4) 中，稀释 Ac WEHD-AMC 和 Ac YVAD-AMC 底物至 40 μ M，并以 1:1 的体积比 (v/v) 添加底物试剂。用 LabSystems Ascent 荧光计在 5 个小时内进行读数。所示数据代表了 2.5 小时的荧光计读数，这产生了最高的信噪比。(信噪比 = 信号 - 本底 / 本底标准偏差)。

6.D. 温度

Caspase-Glo® 1 Assay 的发光信号衰减强度和速率取决于 caspase 活性的降低速率和萤光素酶反应的速率。影响萤光素酶反应速率的环境因素，如温度，也会影响光输出强度和发光信号的稳定性。为了获取一致结果，务必每次实验平衡检测孔板至一个恒定温度。在大多数情况下，在发光测量之前，通过不少于一小时的室温孵育，孔板可以平衡至室温。但是，与单层板相比，从 37℃ 培养箱中取出并在室温下高高堆叠放置的孔板需要更长的平衡时间。在批量处理多个检测孔板时，在各孔板上添加阳性和阴性对照，以说明由于温度等环境因素引起的任何变化。

6.E. 化学品

萤光素酶反应的化学环境可影响酶活性，并由此影响发光强度。我们已观察到了由不同类型的培养基和血清导致的发光强度差异。用于各种化合物的溶剂可能会影响萤光素酶反应，从而影响检测的光输出。

6.F. 混匀

无需在添加 Caspase-Glo® 1 Reagent 之后进行混匀。但是，如果观察到了细胞裂解不完全或重复孔检测信号强度的显著变化，那么建议混匀检测试剂，以有助于细胞裂解并提高各孔之间的再现性。

6.G. 发光检测仪

不同制造商的发光检测仪在灵敏度和动态范围上各不相同。参阅发光检测仪的操作手册，以确定最佳设置。如有必要，进行预实验，以确保 Caspase-Glo® 1 Assay 信号在仪器的线性范围内。个别发光检测仪可能需要不同的增益或灵敏度设置。建议优化仪器的增益或灵敏度设置。

7. 参考文献

1. O' Brien, M. et al. (2017) A bioluminescent caspase-1 activity assay rapidly monitors inflammasome activation in cells. *J. Immunol. Methods* **447**, 1–13.
2. Lamkanfi, M. and Dixit, V.M. (2017) The inflammasome turns 15. *Nature* **548**, 534–35.
3. Nowarski, R. et al. (2013) Innate immune cells in inflammation and cancer. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 77–84.
4. Strowig, T. et al. (2012) Inflammasomes in health and disease. *Nature* **481**, 278–86.
5. Netea, M.G. et al. (2010) IL-1 β processing in host defense: Beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog.* **6**, e1000661.
6. Garcia-Calvo, M. et al. (1998) Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* **273**, 32608–13.
7. Muñoz-Planillo, R. et al. (2009) A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J. Immunol.* **183**, 3942–8.
8. Craven, R.R. et al. (2009) *Staphylococcus aureus* α -hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS ONE* **4**, e7446.
9. Kahlenberg, J.M. and G.R. Dubyak (2004) Differing caspase-1 activation states in monocyte versus macrophage models of IL-1 β processing and release. *J. Leukoc.* **76**, 676–84.
10. Kahlenberg, J.M. et al. (2005) Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR signals and requires NF- κ B-driven protein synthesis. *J. Immunol.* **175**, 7611–22.
11. He, Y., Franchi, L. and Núñez, G. (2013) TLR agonists stimulate nlrp3-dependent IL-1 β production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. *J. Immunol.* **190**, 334–9.
12. Kanneganti, T.D. et al. (2006) Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**, 233–6.
13. Hayashi, F. et al. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099–103.
14. Zhao, Y. et al. (2011) The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* **477**, 596–600.
15. Muñoz-Planillo, R. et al. (2013) K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* **38**, 1142–53.
16. Martinon, F. et al. (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237–41.
17. Riteau, N. et al. (2012) ATP release and purinergic signaling: A common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis.* **3**, e403.
18. Walsh, J.G. et al. (2011) Caspase-1 promiscuity is counterbalanced by rapid inactivation of processed enzyme. *J. Biol. Chem.* **286**, 32513–24.

19. Pop, C. and Salvesen, G.S. (2009) Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* **284**, 21777–81.
20. McStay, G.P., Salvesen, G.S. and Green, D.R. (2008) Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: Implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ.* **15**, 322–31.
21. Thornberry, N.A. et al. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 17907–11.
22. Moravec, R.A. et al. (2009) Cell-based bioluminescent assays for all three proteasome activities in a homogeneous format. *Anal. Biochem.* **387**, 294–302.
23. O’ Brien, M.A. et al. (2005) Homogeneous bioluminescent protease assays: Caspase-3 as a model. *J. Biomol. Screen.* **10**, 137–48.
24. O’ Brien, M.A. (2006) A comparison of homogeneous bioluminescent and fluorescent methods for protease assays. In: *Handbook of Assay Development in Drug Discovery*, Lisa Minor ed., CRC Press.
25. Garcia-Calvo, M. et al. (1999) Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ.* **6**, 362–9.

8. 缓冲液和溶液的成分

caspase-1 酶稀释缓冲液

10 mM	HEPES 缓冲液 (pH 7.4)
0.1%	Prionex [®]
2mM	DTT

9. 相关产品

细胞活力检测

产品	规格	目录号
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	100 assays	G9711
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	10 ml	G9241
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10 ml	G7570
CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay	10 ml	G9681
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10 ml	G6080
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	20 ml	G8080

其他规格可供选择。

细胞毒性检测

产品	规格	目录号
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10 ml	G8741
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10 ml	G9290
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10 ml	G9260
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay	10 ml	J2380

其他规格可供选择。

基于机制的活力和细胞毒性检测

产品	规格	目录号
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	10 ml	G6320
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	10 ml	G6410

其他规格可供选择。

凋亡检测

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 3/7 Assay	10 ml	G8091
Caspase-Glo® 8 Assay	10 ml	G8201
Caspase-Glo® 9 Assay	10 ml	G8211
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	10 ml	G7790
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	100 assays	JA1011

其他规格可供选择。

新陈代谢检测

产品	规格	目录号
NAD(P)H-Glo™ Detection System	10 ml	G9061
NAD/NADH-Glo™ Assay	10 ml	G9071
NADP/NADPH-Glo™ Assay	10 ml	G9081
Lactate-Glo™ Assay	5 ml	J5021
Glucose-Glo™ Assay	5 ml	J6021
Glucose Uptake-Glo™ Assay	5 ml	J1341
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	5 ml	J8021

其他规格可供选择。

线粒体毒性

产品	规格	目录号
Mitochondrial ToxGlo™ Assay	10 ml	G8000
	100 ml	G8001

氧化应激检测

产品	规格	目录号
ROS-Glo™ H ₂ O ₂ Assay	10 ml	G8820
GSH-Glo™ Glutathione Assay	10 ml	V6911
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10 ml	V6611

其他规格可供选择。

细胞色素 P450 基于细胞的检测

产品	规格	目录号
P450-Glo™ CYP1A2 Induction/Inhibition Assay	10 ml	V8421
P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	10 ml	V9001
P450-Glo™ CYP2C9 Assay	10 ml	V8791
P450-Glo™ CYP2B6 Assay	10 ml	V8321

其他规格可供选择。

检测仪器

产品	规格	目录号
GloMax® Discover System	一套	GM3000

10. 内容变更总结

以下是对此文件 5/19 修订版的更改：

1. 添加了 100 ml 的试剂盒（目录号：G9953）。
2. 备注了 4.A 中的批量处理和发光信号稳定性。
3. 管理变更。

^(a) U.S. Pat. Nos. 7,148,030, 7,384,758, 7,666,987 and 8,071,328, Japanese Pat. No. 4451663 and other patents pending.

^(b) European Pat. No. 1131441 and Japanese Pat. No. 4520084.

© 2015–2019 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Apo-ONE, Caspase-Glo, CellTiter-Blue, CellTiter-Glo, GloMax and Instinct are registered trademarks of Promega Corporation. ApoLive-Glo, ApoTox-Glo, CellTiter-Fluor, CellTox, CytoTox-Fluor, CytoTox-Glo, GSH-Glo, GSH/GSSG-Glo, Glucose-Glo, Glucose Uptake-Glo, Glutamine/Glutamate-Glo, Lactate-Glo, LDH-Glo, Mitochondrial ToxGlo, NAD/NADH-Glo, NADP/NADPH-Glo, NAD(P)H-Glo, P450-Glo, RealTime-Glo, ROS-Glo and Ultra-Glo are trademarks of Promega Corporation.

Prionex is a registered trademark of Pentapharm Ltd. Synergy is a trademark of BioTek Instruments, Inc.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.