

## 百萤生物带你走近细胞凋亡检测（二）

细胞凋亡之所以成为人们研究的一个热点，在很大程度上决定于细胞凋亡与临床病毒的密切关系。这种关系不仅表现在凋亡及其机制的研究，阐明了一大类免疫病的发病机制，而且由此可以导致疾病新疗法的出现。Caspase 家族在细胞凋亡中起着至关重要的作用，今天百萤带你来了解一下 Caspase 家族与细胞凋亡千丝万缕的联系。

### Caspase:

**概念：**Caspases 是近年来发现的一组存在于胞质溶胶中的结构上相关的半胱氨酸蛋白酶，它们的一个重要共同点是活性位点都含有半胱氨酸，并特异地断开天冬氨酸残基后的肽键。Caspase 一词是从 Cysteine aspartic acid specific protease 的字头缩写衍生而来，就反映了这个特征，而这种高度的特异性，在蛋白酶中是很少见的。

**机制：**半胱天冬酶是细胞质天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶，其作为细胞凋亡的主要介质。它们的活化受 Bcl-2 和 IAP 蛋白家族成员的调节。在接收外部或内在死亡信号后刺激活化，这导致细胞内衔接子分子聚集在受体相关细胞溶质复合物上的 procaspase。procaspase 的聚集通过二聚化或二聚化然后自身蛋白水解切割启动胱天蛋白酶活化。最初的半胱天冬酶活化导致额外的半胱天冬酶蛋白水解直观地扩增半胱天冬酶级联反应。

### 细胞凋亡启动子半胱天冬酶及其各自的分析

根据它们在半胱天冬酶级联反应中的作用，半胱天冬酶进一步细分为凋亡启动子半胱天冬酶和凋亡效应半胱天冬酶。凋亡启动子半胱天冬酶如胱天蛋白酶-2, -8, -9 和-10 可以启动半胱天冬酶激活级联反应。例如，胱天蛋白酶-8 对于诱导死亡的信号传导复合物 (DISC) 的形成是必需的，并且当激活时，半胱天冬酶-8 激活下游效应子半胱天冬酶。已证明胱天蛋白酶-8 对 IETD 肽序列显示出相对高的底物选择性。百萤生物利用这种酶 - 底物相互作用开发出有效且稳定的试剂盒，用于检测 caspase-8 活性。

百萤生物提供三种选择的 **Cell Meter™ Caspase 8 活性细胞凋亡检测试剂盒**，可与不同的过滤器兼容。每个试剂盒含有独特的荧光指示剂，其由与底物选择性 IETD 肽序列缀合的特定荧光发色团 AMC, R110 或 ProRed™ 组成。该测定可以容易地优化用于高通量筛选并且量化凋亡细胞中活化的胱天蛋白酶-8 的活性或筛选半胱天冬酶 8 抑制剂。

## 细胞凋亡效应 Caspase 及其各自的检测

细胞凋亡效应 caspase 如 caspase-3, -6 和-7 可能不是启动级联途径的原因，但是当它们被激活时，它们在级联的中间和后续步骤中起着不可或缺的作用。例如，caspase-3 是一种关键的效应因子，因为它可以放大来自启动子半胱天冬酶的信号，并且表示完全致力于细胞分解。使用 DEVD 肽序列进行活化的胱天蛋白酶-3 的检测，所述 DEVD 肽序列对胱天蛋白酶-3 具有选择性，并证明在开发胱天蛋白酶-3 底物方面是成功的。百萤生物提供两套独特的试剂盒，用于检测 caspase-3/7 活性：**Amplite™ 荧光 Caspase 3/7 检测试剂盒**和 **Cell Meter™ Caspase 3/7 活性细胞凋亡试剂盒**。

Amplite™ 荧光 Caspase 3/7 检测试剂盒有三种选择。每个试剂盒都含有一个用荧光发色团 AMC, R110 或 ProRed™ 修饰的 caspase-3 选择性 DEVD 肽序列，每个序列都有其独特的优势。基于 Z-DEVD-R110 的半胱天冬酶底物由于其两步裂解过程而表现出较窄的动态范围。它们比基于香豆素的半胱天冬酶底物更敏感，推荐用于终点分析。基于 AMC 和 AFC 的半胱天冬酶底物最适合动力学测

定。虽然我们的 ProRed™-DEVD 基板具有更长的激发和发射波长，因此它们对于筛选 caspase3 / 7 抑制剂非常有用。

**Cell Meter™ Caspase 3/7 活性细胞凋亡试剂盒**也有三种选择，每种都有荧光指示剂底物，用不同的荧光发色团修饰。这些试剂盒旨在通过测量 caspase-3 活化来监测细胞凋亡。它们耐用性很高、适用范围很广，可以很容易地适用于各种荧光平台（如微孔板分析）中的高通量测定。

## 信号通路用于细胞凋亡

细胞凋亡传统上被认为是不可逆的过程，因此细胞凋亡的起始必须通过特定的激活机制严格调节。两种最广泛研究和理解的细胞凋亡激活机制是外在和内在途径。百萤生物的 caspase 检测试剂盒已经过优化，可检测和分析半胱天冬酶的活化，因为它们将凋亡信号传递到外源或内源途径。

### 外在途径：

负责启动细胞凋亡的外源凋亡信号传导途径使用肿瘤坏死因子（TNF）受体与其相应配体或死亡受体之间的跨膜受体介导的相互作用。TNF 受体由富含半胱氨酸的细胞外结构域和 80 个氨基酸的细胞质结构域组成。死亡受体及其相应配体的二聚化激活受体复合物以开始凋亡信号的透射。在二聚化时，衔接蛋白如 FADD 的募集引发胱天蛋白酶原-8 募集至死亡诱导信号转导复合物。procaspase-8 寡核苷酸化至死亡诱导信号复合物导致蛋白水解切割和胱天蛋白酶-8 活化。（对于外在途径机制，请参考下面的图 1）

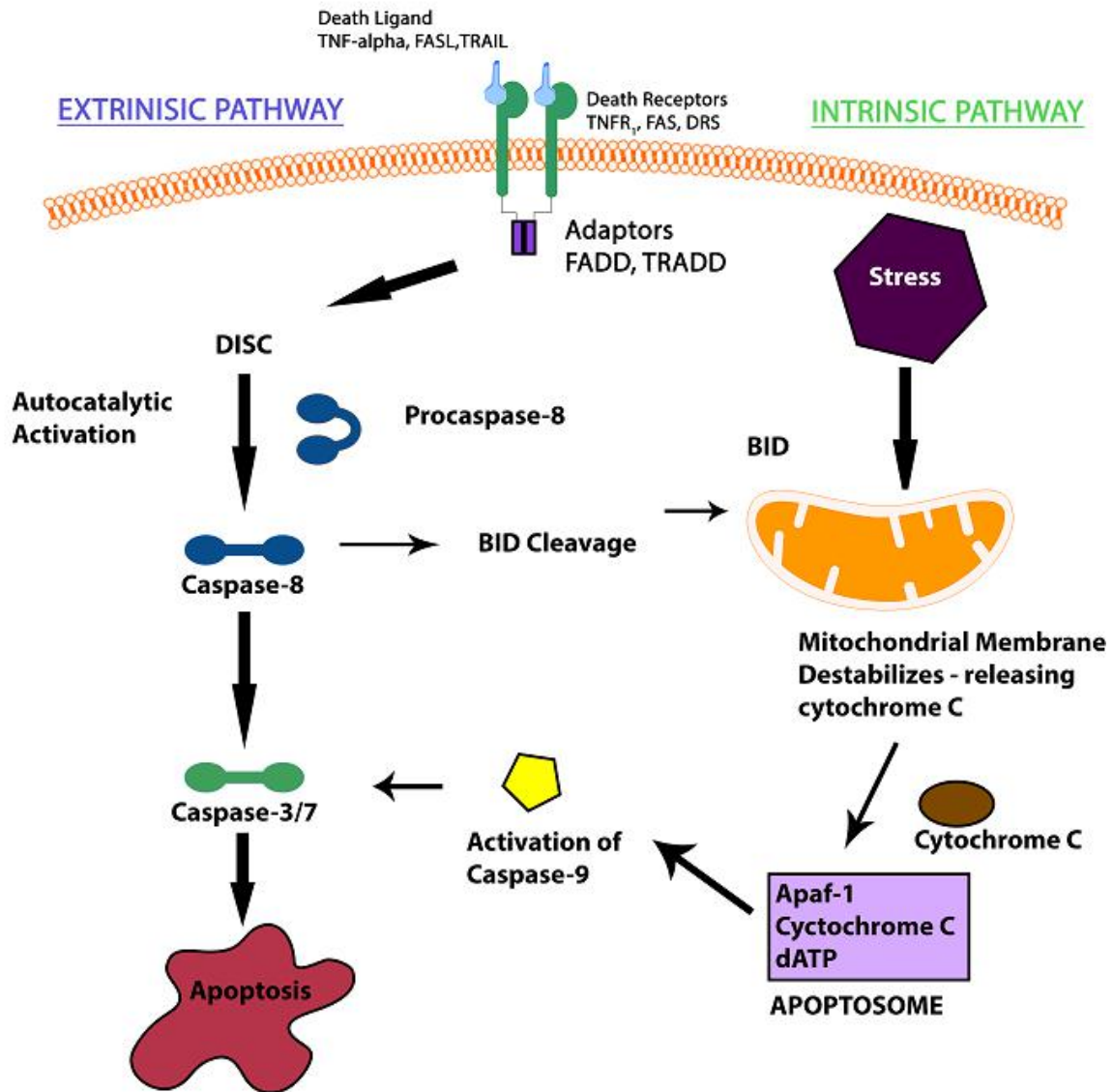


图 1. 显示外在和内在的凋亡信号传导途径

半胱天冬酶结合测定在检测负责启动细胞凋亡的外在信号传导途径中的关键事件方面是极好的，例如启动子和效应子半胱天冬酶的活化。百萤生物提供全面的 Cell Meter™活细胞半胱天冬酶结合试剂盒系列，使用荧光细胞渗透和无毒指示剂检测 caspase-1, -2, -3 / 7, -6, -8, -9, -10 和 13 活动。在与其适当的半胱天冬酶结合后，荧光试剂保留在细胞内。该结合事件阻止半胱天冬酶的任何进一步

催化而不停止细胞凋亡过程。这些半胱天冬酶结合试剂盒适用于荧光显微镜，流式细胞仪和荧光微板读数器。半胱天冬酶测定可以与其他细胞凋亡测定结合进行，以阐明外在和内在凋亡途径之间的任何关系。例如，使用半胱天冬酶结合测定结合检测线粒体膜电位变化的测定法可以揭示外在和内在凋亡信号传导途径之间的任何潜在的“串扰”。

### 内在途径：

内源性凋亡信号传导途径由线粒体信号传导蛋白介导。它的功能是响应各种类型的细胞内刺激，如 DNA 损伤，生长因子戒断和死亡受体刺激。接收细胞内刺激激活促凋亡蛋白，例如 BH3 相互作用结构域死亡激动剂或 BID。Bcl-2 家族的其他成员，如 Bax，与 BID 蛋白相互作用，允许它们插入线粒体外膜。线粒体膜不稳定，允许形成线粒体凋亡诱导的通道，其促进细胞色素 c 释放到细胞质中。细胞色素 c 是促凋亡因子，其与蛋白质凋亡蛋白酶激活因子-1 (APAF-1) 相互作用，其募集胱天蛋白酶原-9 以形成凋亡体复合物。该复合物的形成裂解并激活凋亡引发剂 caspase-9 以启动半胱天冬酶级联反应，最终导致细胞凋亡。**(对于外在途径机制，请参考上面的图 1)**

检测线粒体膜电位 (MMP) 的变化是内在激活细胞凋亡的重要指标。百萤生物开发了专有的阳离子线粒体探针，可灵敏地检测靶细胞线粒体膜电位的任何变化。这些专有探针可作为百萤生物的 Cell Meter™ MMP 检测试剂盒中的关键组分，用于监测细胞活力。在正常细胞中，这些线粒体探针发出红色荧光，其信号强度与线粒体内积累的探针量成比例。能够在线粒体内积聚的探针越多，发出的荧光信号越强烈。然而，在凋亡细胞中，在 MMP 崩溃后，线粒体染料的荧光强度减弱，表明细胞色素 C 释放到细胞质中，从而引发细胞凋亡的 caspase 级联反应。这些试剂盒已经过单独优化，可用于荧光显微镜和荧光和流式细胞仪检测中的凋亡激活剂和抑制剂的筛选。该试剂盒可与其他试剂结合使用，如 **Cell Meter™ 磷脂丝胺酸细胞凋亡检测试剂盒**，用于细胞活力和细胞凋亡的多参数研究。