

Caspase-8 活性检测试剂盒

中文名称：**Caspase-8 活性检测试剂盒**

英文名称：Caspase-8Activity 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-8 也称 FLICE、MACH 或 Mch5，通常以酶原的形式存在，凋亡时激活，被认为是细胞凋亡转导过程的上游 caspase。在 Fas-receptor 和 TNFR-1 介导的凋亡过程中 caspase-8 被激活形成二聚体，进而激活下游 caspase-4、6、9、10。

本试剂盒测定原理基于 Caspase-8 特异水解其多肽底物 Ac-IETD-pNA

(N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroanilide)，释放出游离的硝基苯胺 pNA，后者呈黄色在 405nm 具有大吸收峰，采用可见光光度比色法进行测定。其吸光度值对应于 Caspase-8 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。

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 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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-8 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

Caspase-8 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。

$$\text{Caspase-8 活性 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 = 2x \div \text{Cpr} \div T$$

V 反总：反应体系总体积，0.1mL=10⁻⁴L；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。