



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: -20°C

产品包装: 盒装

检测方法: 比色法

有效期: 6个月

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 20mL×1 瓶 | 液体 25mL×1 瓶 | -20°C保存 |
| 试剂二 | 液体 30mL×1 瓶 | 液体 60mL×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 1mL×1 支 | 液体 1mL×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 9mL 试剂一加入 1mL 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 15min, 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 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂二), 冰浴研磨或充分剪碎, 置冰上静置 15min, 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 5mmol/LpNA 标准品稀释至 200、100、50、25、12.5、0 $\mu\text{mol/L}$ 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(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 |

三、Caspase-8 活性计算

1. 标准曲线的建立：

根据标准管的浓度 (x , $\mu\text{mol/L}$) 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 $x(\mu\text{mol/L})$ 。

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°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。

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

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。