

Caspase 8活性检测试剂盒(分光光度法)

货号: P-CA-085

产品简介

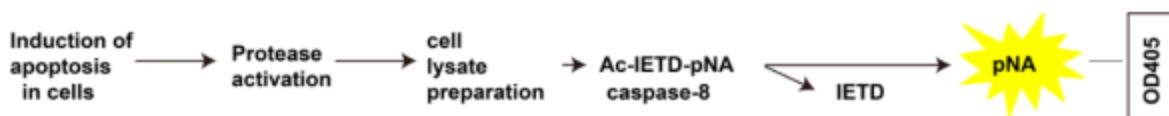
Caspase 8活性检测试剂盒(分光光度法)采用分光光度法,可用于检测细胞、组织裂解液或其它样本的caspase 8活性。

背景介绍

Caspase 8又名FLICE、MACH和Mch5, Caspase 8可以自我活化,也可以在颗粒酶B的剪切下活化。Caspase 8特异性识别的序列是IETD, 活化的caspase 8不但可以剪切PARP, 而且还参与其它ICE家族蛋白酶, 如caspase 3和caspase 7的活化过程。

检测原理

本caspase 8活性检测试剂盒是基于caspase 8可以催化底物Ac-IETD-pNA产生黄色的pNA(p-nitroaniline), pNA在405nm附近有强吸收, 从而可以通过测定吸光度来检测caspase 8的活性。



检测样本类型

细胞样本 组织样本

产品组分

产品名称	20 Assays	50 Assays	100 Assays	Storage
Cell Lysis Buffer	10 mL	25 mL	50 mL	-5~-20°C
2×Reaction Buffer	10 mL	25 mL	50 mL	-5~-20°C
Ac-IETD-pNA(4 mM)	100 μL	250 μL	500 μL	-5~-20°C;避光
pNA (10 mM)	200 μL	500 μL	1 mL	-5~-20°C;避光
说明书			一份	

保存条件

-5~-20°C可保存12个月。Ac-IETD-pNA (4 mM)应适当分装并避光保存, 避免反复冻融。

自备试剂及仪器

1) 试剂

网站: www.procell.com.cn

电话: 400-999-2100; 027-87287608

邮箱: sales@procell.com.cn

地址: 湖北省武汉市高新大道858号生物医药产业园三期C4栋



PBS、蛋白定量试剂盒（Bradford法）。

2) 仪器

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、恒温培养箱、移液器、研钵或匀浆器。

注意事项

1. 所有待检样本都需检测蛋白浓度，由于样本裂解液中含有还原剂，不适合使用BCA法进行蛋白浓度测定，推荐使用考马斯亮蓝法（Bradford法）。
2. 建议在正式实验前，选择 2~3 个预期差异大的样本进行预实验，若样本吸光值超过标准曲线的测量范围，则需稀释样本或者调整上样量再进行测定。
3. 进行caspase 8活性测定的样本，其蛋白浓度应在1~4mg/mL，否则会影响实验结果的准确性。
4. 一次实验的细胞数目建议不低于 1×10^6 个，组织样本不低于50mg，以便达到1~4mg/mL的蛋白浓度。否则会影响实验的精准度，导致蛋白浓度过低，反应体系内活性caspase 8过少而OD值偏低。

准备工作

1. Cell Lysis Buffer溶解后混匀，冰浴备用。
2. 2×Reaction Buffer溶解后混匀，冰浴备用。
3. Ac-IETD-pNA和pNA溶解后混匀，冰浴备用。

样本准备

1) 细胞样本

按照常规方法收集细胞沉淀，PBS重悬细胞并计数， $600 \times g$ 离心5 min，弃上清，按照每100万细胞加入100 μ L Cell Lysis Buffer的比例加入预冷的Cell Lysis Buffer重悬细胞，在冰浴条件下裂解30 min，裂解期间需涡旋震荡3~4次，每次10 s。裂解后的样本，于4°C， $11000 \times g$ 离心10~15 min，小心地吸取上清至新的EP管中，并置于冰上待用。同时使用Bradford法测定蛋白浓度。

注：检测贴壁细胞时，需收集诱导后产生的悬浮细胞，并与后续收集的贴壁细胞一起检测。

2) 组织样本

取50 mg待测组织样本，用PBS或者生理盐水清洗1-2次，去除组织中残留的血细胞，用手术剪剪碎，加入200 μ L预冷的Cell Lysis Buffer，进行匀浆（在冰浴条件下进行，若组织质量加倍时，加入的预冷Cell Lysis Buffer也需加倍）。将匀浆好的样本转移至1.5 mL离心管中，冰浴裂解30 min。裂解后的样本，于4°C， $11000 \times g$ 离心10~15 min，小心地吸取上清至新的EP管中，并置于冰上待用。同时使用Bradford法测定蛋白浓度。

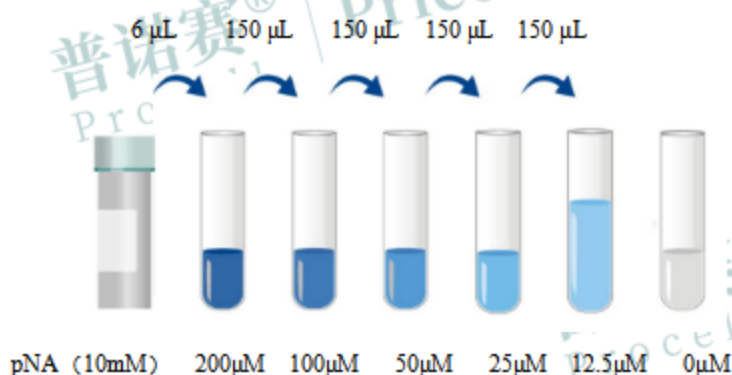
注：制备好的样本应立即测定，若无法及时测定，可将裂解后的上清保存在-80°C，2周内进行检测。



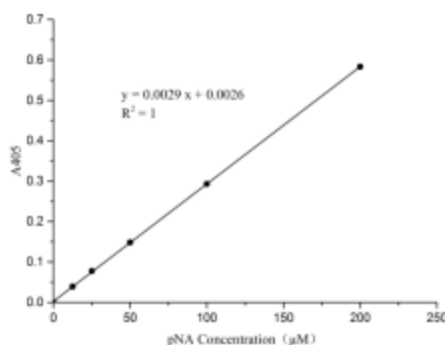
实验步骤

1. 制备pNA标准曲线（选做）

- 1) 配制标准品稀释液：取冰浴的Cell Lysis Buffer和2×Reaction Buffer，按照1:1配制标准品稀释液，涡旋或吹打混匀。
- 2) 进行倍比稀释：取6支EP管，第一支EP管中加入294 μL标准品稀释液，其他每管中加入150 μL标准品稀释液，从pNA (10 mM)的标准品中吸取6 μL到第一支EP管中混匀配成200 μM的标准品工作液，吸取150 μL到第2支EP管，混匀后吸取150 μL到第3支EP管，按此步骤往后依次吸取混匀至第5支EP管，如下图所示：



- 3) 每管取100 μL不同浓度的标准品置于酶标板或比色皿中，检测405 nm下OD值。（为保证实验结果的准确性，建议所有的待测样本和标准品都设立复孔。）
- 4) 绘制标准曲线：分别以标准品浓度和对应绝对OD值（每一个标准品的OD₄₀₅减去不含pNA的OD₄₀₅）作为x轴和y轴，使用图形软件（或 EXCEL）绘制标准曲线，如下图所示。实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。



2. Caspase 8的活性检测

1) 取50 μL样本裂解液，按照下表设置反应体系。

	空白孔	样本孔
Cell Lysis Buffer	50 μL	0 μL
2×Reaction Buffer	45 μL	45 μL
待测样品	0 μL	50 μL
Ac-IETD-pNA	5 μL	5 μL
总体积	100 μL	100 μL

注意：在设置反应体系时，先加入反应液，再加入待测样本后适当混匀，最后加入Ac-IETD-pNA并混匀，所有加液步骤注意避免气泡产生。

2) 加入Ac-IETD-pNA后混匀，37°C孵育1~2h，发现颜色变化较明显时即可检测OD405。若颜色变化不明显，可适当延长孵育时间到4h。

结果计算

方法一：按照酶活性增加的百分比计算

$$\text{Caspase 8活性百分比} = \frac{\text{OD}_{\text{样本}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}}{\text{Cpr}_{\text{样本}}} \div \frac{\text{OD}_{\text{阳性}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}}{\text{Cpr}_{\text{阳性}}} \times 100\%$$

注：阴性对照为不做凋亡处理的生物学对照组。

方法二：按照酶活计算

1. 建立标准曲线：根据标准管的浓度 (x, μmol/L) 和吸光度 (y, 减去浓度为 0 的空白管) 做标准方程 $y=ax+b$ 。

2. 计算caspase 8酶活力：

Caspase 8酶活力单位的定义：One unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0 nmol of the colorimetric substrate Ac-IETD-pNA 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1 nmol Ac-IETD-pNA产生1 nmol游离的 pNA的caspase 8的酶量。

$$\text{Caspase 8 activity (U/mgprot)} = \frac{\Delta A - b}{a} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} \times f$$

注：

y: 标准品测定OD值-空白OD值;

x: 标准品的浓度;

a: 标曲的斜率;

b: 标曲的截距;

ΔA: 测定孔OD值-空白孔OD值;

V反总: 反应体系总体积, 0.1 mL

V样: 加入的样本体积, 0.05 mL;

T: 反应时间, h

Cpr: 样本加入检测体系前的蛋白质浓度, mgprot/mL; f: 样本加入检测体系前的稀释倍数



常见问题及解决方案

现象	可能原因	建议
OD405值偏低或无信号	焦亡现象不明显或者细胞处于焦亡晚期, 细胞破碎死亡.	焦亡现象不明显以及诱导过度至细胞死亡均无法有效检测到 caspase 8 的活化, 可设置梯度诱导浓度和诱导时间选择最佳的诱导方案.
	细胞诱导时的密度太大.	降低诱导时细胞的密度, 摸索最佳诱导密度, 推荐诱导浓度为 $5 \sim 10 \times 10^5 / \text{mL}$.
	细胞数目太少, Cell Lysis Buffer 太多.	增加细胞的数量, 每100万细胞加入 $50 \sim 100 \mu\text{L}$ Cell Lysis Buffer.
	检测总蛋白量较低.	使用 Bradford 法测浓度, 提高蛋白检测的总量, 可以进行预实验检测, 检测总蛋白不低于 $50 \mu\text{g}$.
	温度较高, Cell Lysis Buffer 中的 DTT 失活, Caspase 酶失活.	Cell Lysis Buffer 和细胞裂解过程在冰上进行, 每10分钟进行涡旋混匀一次, 充分保证酶活.
	细胞沉淀的保存条件不佳, 导致细胞降解, Caspase 酶失活.	收集细胞沉淀后立即放入 -20°C (1个月) 或者 -80°C (2个月) 保存备用, 规定时间内进行检测.
	波长范围选择错误.	最佳检测波长为 405nm , 若仪器不符合, 可选择 $405 \pm 20 \text{ nm}$ 范围.
37°C 孵育时间过长.	适当延长 37°C 孵育时间, 建议最佳孵育时间为 $1 \sim 2$ 小时内, 随着时间延长, control 组的背景数值会逐渐增大, 导致结果偏低.	
OD405值偏高	细胞处理试剂或者药物有颜色, 且在 405 nm 波长有吸收峰.	增加细胞离心洗涤的次数, 设置细胞处理试剂的空白对照, 最终实验结果减去药物试剂的影响.
	检测样本中有较多气泡.	排除气泡后再检测.
	使用回收的96孔板中有杂质附着, 导致结果偏高.	建议使用新的一次性96孔板.

声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项, 遵守实验室试剂操作规范操作。
3. pNA (4-硝基苯胺) 对人体有毒, 操作时请特别小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。pNA 在较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内, 可以 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 水浴温育片刻至全部融解后使用。
4. 样品中激活的 caspase 水平较低时, 首先确认焦亡或者凋亡现象是否明显。如果细胞焦亡或者凋亡比较明显且确认该 caspase 是可以被激活的, 可适当调节诱导细胞的时间, 找到一个 caspase 激活比较强的时间点, 以便检测出该 caspase 的激活。可作时间曲线, 例如诱导 0、2、4、8、16 和 24 小时, 或 0、1、2、4、8 和 16 小时, 或 0、1、2、4、6 和 8 小时等。具体的诱导凋亡时间需根据具体情况而定。
5. 在本试剂盒的反应体系中, 底物的起始浓度为 0.2 mM , 对于绝大多数样品来说, 在 37°C 孵育 2 个小时以内底物都是饱和的, 针对少数样品中 caspase 8 酶活力特别高的情况, 须用 Cell Lysis Buffer 适当稀释样品后再进行测定。

网站: www.procell.com.cn

电话: 400-999-2100; 027-87287608

邮箱: sales@procell.com.cn

地址: 湖北省武汉市高新大道858号生物医药产业园三期C4栋

