Caspase-8 活性检测试剂盒说明书

比 色 法

规格：20 T、50T、100T

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	20T规格	50T规格	100T规格	保存条件
试剂一	液体20mL×1瓶	液体20mL×1瓶	液体25mL×1瓶	-20℃保存
试剂二	液体30 mL×1瓶	液体60mL×1瓶	液体120mL×1瓶	-20℃保存
试剂三	液体0.25mL×1支	液体0.55mL×1支	液体0.55mL×2支	-20℃保存
标准品	液体1mL×1支	液体1mL×1支	液体1mL×1支	-20℃保存

溶液的配制：

1、 试剂一：分装-20℃保存。

2、 试剂二：分装-20℃保存。

3、 标准品：pNA 标准溶液，5mmol/L 。 标准溶液在4℃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 具有最大吸收峰，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。

N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-P-Nitroanilide .Caspase-8→ P-Nitroanilide(405nm)

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 μL 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。

操作步骤：

一、样本处理(可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献)

1. 培养细胞：先收集细胞到离心管，离心后弃上清；按照细胞数量(约106个)加100 μL 试剂二(若裂解不充分可提高至150-200 μL), 震荡重悬沉淀，置冰上静置15min,15000g4℃ 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℃,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, 分光光度计蒸馏水调零。

2、 标准溶液的稀释：将5mmol/LpNA 标准品用标准品稀释液稀释至200、100、50、25、12.5、0μmol/L 的标准溶液备用。

3、标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度(μmol/L)	标准溶液体积(μL)	标准品稀释液体积(μL)	稀释后浓度(μmol/L)
1	5000	40	960	200
2	200	500	500	100
3	100	500	500	50
4	50	500	500	25
5	25	500	500	12.5
6	0	0	500	0

下述实验中每个标准管需100μL 标准溶液

4、在96孔板/EP管中按下表步骤加样：

试剂名称(μL)	测定管	空白管	标准管
试剂一	40	40	7
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℃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△A测定=A测定管-A空白管。			立即测定405nm下吸光度。标准曲线只需做1-2次。

三、Caspase-8 活性计算

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度 (x,μmol/L) 和△A 标准 (y, 减去浓度为0的标准管吸光值)做标准方程。将△A 测定代入标准方程得到x(μmol/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)×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℃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。

Caspase-8 活性(U/mg prot)=x×V反总÷(V 样×Cpr)÷T×10^3=2x÷Cpr÷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;10^3: 单位换算系数，1μmol=10^3nmol。

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 活性测定值低最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，以检测最佳的观察点。

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℃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。