

(本试剂仅供体外研究使用, 不用于临床诊断!)

Caspase 8 活性检测试剂盒(分光光度法)

货号: E-CK-A312

规格: 20 T / 50 T / 100 T

产品编号	产品名称	20 T	50 T	100 T	Storage
E-CK-A312A	裂解液	3.0 mL	7.5 mL	15 mL	-20°C
E-CK-A312B	2 ×反应液	1.0 mL	1.25 mL x 2	5.0 mL	-20°C
E-CK-A312C	Ac-IETD-pNA	100 µL	250 µL	500 µL	-20°C
E-CK-A312D	DTT	50 µL	100 µL	150 µL	-20°C
说明书			一份		

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题, 请通过以下方式联系我们:

全国免费电话 400-9627-365
销售部电话 027-65022280, 027-87854967
技术部电话 027-65521719
电子邮箱(销售) Perry@elabscience.cn
电子邮箱(技术) Flow@elabscience.cn
QQ 客服 800110755
网址 www.elabscience.cn

联系时请提供产品货号(见标签), 以便我们更高效地为您服务。

产品简介

Elabscience®自主研发的 Caspase 8 活性检测试剂盒采用分光光度法，可用于检测细胞、组织裂解液或纯化的 Caspase 8 活性。

检测原理

Caspase (Cysteine-requiring Aspartate Protease)是在细胞凋亡过程中起重要作用的蛋白酶家族。Caspase 8 也称 FLICE、MACH 或 Mch5, Caspase 8 被认为是细胞凋亡信号转导过程中上游的一个 Caspase, 在 Fas-receptor 和 TNFR-1 介导的细胞凋亡过程中 Caspase 8 被激活, 形成一个由 p18 和 p10 组成的二聚体, 进一步激活下游的 Caspase 4, Caspase 6, Caspase 9 和 Caspase 10。Caspase 8 在正常状态下以酶原的形式存在于胞浆中, 无活性; 在细胞发生凋亡阶段, Caspase 8 被激活, 参与细胞凋亡过程。

Caspase 8 分光光度法检测试剂盒的原理是将 Caspase 8 序列特异性的多肽 (Ac-IETD-pNA (acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp p-nitroanilide) 偶联至黄色基团 pNA (p-nitroaniline)。当该底物被 Caspase 8 剪切后, 黄色基团 pNA 游离出来, 可通过酶标仪或分光光度计 ($\lambda = 405 \text{ nm}$ 或 400 nm) 测定其吸光值, 通过测定吸光度来检测 Caspase 8 的活性。

自备试剂

PBS(推荐使用 Elabscience®E-BC-R187)、蛋白定量试剂盒(Bradford 法, 选用, 推荐使用 Elabscience®E-BC-K168-S)

实验操作指南

1. 准备工作

- A、裂解液[E-CK-A312A]溶解后混匀, 冰浴备用。
- B、裂解液工作液制备: 每 50 μL 裂解液[E-CK-A312A]中加入 0.5 μL DTT[E-CK-A312D], 冰浴备用。

2. 样本处理

A、悬浮细胞

- 1) 诱导完成后的细胞, 2,000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞, PBS 轻轻重悬细胞并计数。
- 2) 2,000 rpm 离心 5 min, 弃上清。按照每 200 万细胞加入 50 μL 裂解液的比例加入预冷的裂解液工作液, 重悬细胞。冰浴裂解 30 min, 期间涡旋震荡 3~4 次, 每次 10 s。

B、贴壁细胞

- 1) 按常规方法用胰酶消化贴壁细胞, 收集细胞后 2,000 rpm 离心 5 min, 弃上清。PBS 轻轻重悬细胞并计。
- 2) 2,000 rpm 离心 5 min, 弃上清。按照每 200 万细胞加入 50 μL 裂解液的比例加入预冷的裂解液工作液, 重悬细胞。冰浴裂解 30 min, 期间涡旋震荡 3~4 次, 每次 10 s。

C、组织样本

1) 取 50 mg 组织置于培养皿中，手术剪剪碎，加入 200 μL 预冷的裂解液工作液，在冰上用玻璃匀浆器匀浆(组织量加倍时，加入的预冷裂解液也加倍)。

2) 将匀浆好的样本转移到 1.5 mL 的离心管中，冰浴放置 5 min 裂解。

3. 12,000 rpm 在 4°C 下离心 10~15 min。

4. 小心地吸取上清转移至新的 EP 管中，并置于冰上待用。

5. 立即测定 Caspase 8 的酶活性或者 -70°C 保存样本，亦可取少量样本用 Bradford 法[E-BC-K168-S]测定蛋白浓度。

6. Caspase 8 酶活性检测

A、取 Ac-IETD-pNA[[E-CK-A312C]和 2 \times 反应液[[E-CK-A312B]，溶解后冰浴备用。

B、2 \times 反应液工作液制备：每 50 μL 2 \times 反应液[E-CK-A312B]加入 0.5 μL DTT[E-CK-A312D]。

C、吸取 45 μL 含 100~200 μg 蛋白的细胞或者组织裂解上清，如体积不足 45 μL 用裂解液工作液补足至 45 μL (各组采用相同的蛋白含量和体系进行测定和比较)。

D、按照下表设置反应体系：

	空白对照	样品
2 \times 反应液工作液	50 μL	50 μL
裂解液工作液	45 μL	0 μL
待测样品	0 μL	45 μL
Ac-IETD-pNA	5 μL	5 μL
总体积	100 μL	100 μL

注意：

1) 在设置反应体系时先加入反应工作液，再加入待测样本后适当混匀，注意避免产生气泡。

2) 最后加入 Ac-IETD-pNA 并混匀，注意避免气泡产生。

E、在加入 Ac-IETD--pNA 混匀后，37°C 孵育 2~4 h。发现颜色变化较明显时即可测定 OD405。如果颜色变化不明显可适当延长孵育时间，甚至可孵育过夜。

F、用酶标仪或分光光度计 (100 μL 比色皿) 在 $\lambda = 405 \text{ nm}$ 或 400 nm 测定样本吸光值。

G、通过计算($\text{OD}_{\text{样本值}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}$) / ($\text{OD}_{\text{阴性对照}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}$) 的倍数来确定凋亡诱导剂组 Caspase 8 的活化程度。

参考Chemicon公司的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一个小时可以剪切1 nmol Ac-IETD--pNA产生1 nmol pNA的Caspase 8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 8。

说明：在本试剂盒的检测体系中，底物的起始浓度为0.2 mM，此时底物是饱和的，对于大部分样品而言，在37°C孵育4个小时以内底物都是饱和的；对于样品中Caspase 8酶活力特别高的情况，须用裂解液适当稀释样品后再进行测定。

保存条件

-20°C 保存。Ac-IETD--pNA[E-CK-A312C]应避免反复冻融，请适当分装并避光保存。

注意事项

1. 保质期 1 年。为获得最佳的使用效果，请在 3~6 个月内使用。
2. 因裂解液中含有还原剂，不适合使用 BCA 法测定蛋白浓度，测定蛋白浓度时推荐使用 Elabscience®生产的 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒[E-BC-K168-S]。
3. 有文献报道少数类型的细胞凋亡检测不到 Caspase 8 的激活。可能存在非依赖于 Caspase 8 活化的机制，这种情况下利用本试剂盒检测 Caspase 8 活性无明显改变，需要考虑凋亡机制中的其他信号通路。
4. 本试剂盒的裂解液可以和Elabscience®生产的其它Caspase活性检测试剂盒的裂解液通用，即本试剂盒裂解液制备的蛋白样品可以用于Elabscience®其它Caspase活性检测试剂盒的检测。
5. 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 20-25°C水浴温育片刻至全部融解后使用。
6. 样品中激活的 Caspase 水平较低时，首先确认凋亡现象是否明显。如果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凋亡的时间，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，例如诱导凋亡 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。
7. 本产品仅限专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。