

Caspase-8 活性检测试剂盒说明书

比色法

货号: BC3880

规格: 20T、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, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	20T 规格	50T 规格	100T 规格	保存条件
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	液体 20 mL×1 瓶	液体 25 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂二	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	液体 120 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 0.25 mL×1 支	液体 0.55 mL×1 支	液体 0.55 mL×2 支	-20℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×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, 5 mmol/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 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 405 nm 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。



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、100μL 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 10^6 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 15 min, 15000g 4℃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℃, 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 5 mmol/L pNA 标准品用标准品稀释液稀释至 200、100、50、25、12.5、0 μ mol/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 (μ mol/L)	标准溶液体积 (μ L)	标准品稀释液体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ mol/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 100 μ L 标准溶液

- 4、在 96 孔板/EP 管中按下表步骤加样：

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。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, μ mol/L) 和 ΔA 标准 (y, 减去浓度为 0 的标准管吸光值) 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 $^{\circ}$ 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。

Caspase-8 活性 (U/mg prot) = $x \times V$ 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 $^{-4}$ L；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，1 μ mol=10 3 nmol。



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°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。

相关发表文献:

- [1] Li F, Sun H, Lin X, Li Q, Zhao D, Cheng Z, Liu J, Fan Q. Increased cytochrome C threonine 50 phosphorylation in aging heart as a novel defensive signaling against hypoxia/reoxygenation induced apoptosis. *Aging (Albany NY)*. 2022 Jul 25;14(14):5699-5709. doi: 10.18632/aging.204159. Epub 2022 Jul 25. PMID: 35896004.
- [2] Zhou LL, Gao KY, Cheng LS, Wang YL, Cheng YK, Xu QT, Deng XY, Li JW, Mei FZ, Zhou ZQ. Short-term waterlogging-induced autophagy in root cells of wheat can inhibit programmed cell death. *Protoplasma*. 2021 Jul;258(4):891-904. doi: 10.1007/s00709-021-01610-8. Epub 2021 Jan 23. PMID: 33486619.
- [3] Zhao ZC, Jiang MY, Huang JH, Lin C, Guo WL, Zhong ZH, Huang QQ, Liu SL, Deng HW, Zhou YC. Honokiol induces apoptosis-like death in *Cryptocaryon irritans* Tomont. *Parasit Vectors*. 2023 Aug 16;16(1):287. doi: 10.1186/s13071-023-05910-1. PMID: 37587480; PMCID: PMC10428556.
- [4] Wang M, Wang J, Yasen A, Fan B, Hull JJ, Shen X. Determination of Key Components in the *Bombyx mori* p53 Apoptosis Regulation Network Using Y2H-Seq. *Insects*. 2023 Apr 5;14(4):362. doi: 10.3390/insects14040362. PMID: 37103177; PMCID: PMC10146131.
- [5] Zhang H, Zhou L, Hu S, Gu W, Li Z, Sun J, Wei X, Wang Y. The crosstalk between LINC01089 and hippo pathway inhibits osteosarcoma progression. *J Bone Miner Metab*. 2022 Nov;40(6):890-899. doi: 10.1007/s00774-022-01377-9. Epub 2022 Nov 18. PMID: 36399257.

参考文献:

- [1] Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 1997, 326: 1-16.
- [2] Janicke R U, Sprengart M L, Wati M R, et al. Emerging role of caspase-3 in apoptosis[J]. *Cell Death and Differentiation*, 1999, 6:99-104.

相关系列产品:

- BC3810 Caspase-1 活性检测试剂盒
- BC3820 Caspase-2 活性检测试剂盒
- BC3830 Caspase-3 活性检测试剂盒
- BC3840 Caspase-4 活性检测试剂盒
- BC3850 Caspase-5 活性检测试剂盒
- BC3860 Caspase-6 活性检测试剂盒
- BC3890 Caspase-9 活性检测试剂盒

