



Caspase-8 活性测试盒说明书（简化版）

（货号：G017-1 适用于酶标仪或分光光度计测定）

一、产品简介

Caspase 8 活性分光光度法检测试剂盒是采用分光光度法或酶标法检测细胞或组织裂解液中 Caspase 8 酶活性或纯化的 Caspase 8 酶活性的试剂盒。

Caspase (Cysteine-requiring Aspartate Protease)是一个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，有时被写作 caspase-8 或 caspase8，通常以酶原的形式存在，在细胞凋亡的信号转导过程中被激活。Caspase 8 被认为是细胞凋亡信号转导过程中比较上游的一个 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，没有活性；但在细胞发生凋亡阶段，它被激活。

Caspase-8 活性分光光度法检测试剂盒就是将 Caspase-8 序列特异性的多肽 Ac-IETD-pNA（acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp p-nitroanilide）偶联至发色基团：pNA (p-nitroaniline)；当该底物被 Caspase-8 剪切后，黄色基团 pNA 即游离出来，可通过酶标仪或分光光度计（ $\lambda=405\text{nm}$ 或 400nm ）测定其吸光值，考察 Caspase-8 的活化程度。pNA 在 405nm 附近有强吸收。

本试剂盒适用于培养细胞及新鲜组织 Caspase-8 活性的检测。

二、试剂盒组份

组份	试剂规格			储存条件
	G017-1-1 20T	G017-1-2 50T	G017-1-3 100T	
裂解液	5.0ml	10.0ml	15.0ml	-20℃ 保存
2×反应液	1.0ml	2.5ml	5.0ml	-20℃ 保存
Ac-IETD-pNA	100μl	250μl	500μl	-20℃ 避光保存
DTT	50μl	100μl	150μl	-20℃ 保存

三、试剂盒以外自备仪器和试剂：

低温高速离心机、酶标仪或分光光度计（100μl的比色皿）、微量移液器、玻璃匀浆器（组织样本）1.5ml离心管、PBS、蛋白定量试剂及仪器

四、保存条件：-20℃ 保存，Ac-IETD-pNA需避光保存。



五、操作步骤

1、准备工作：

- a、裂解液溶解后混匀并置于冰浴上备用。
- b、裂解液工作液的准备：使用前每50 μ l裂解液加入0.5 μ l DTT
- c、2 $\times$ 反应液溶解后混匀并置于冰浴上备用

2、样品的处理：

a、对于悬浮细胞：

把没有诱导凋亡的对照样品和诱导凋亡的样品，离心（2000rpm，5min）收集细胞，小心吸除上清，同时确保尽量没有细胞被吸除，PBS洗涤一次。同前吸尽上清后，按照每200万细胞加入50微升裂解液的比例加入裂解液，重悬沉淀，冰浴裂解30min，其间涡旋振荡3~4次，每次10 s；或冻融2~3次。下转第3步进行实验。

b、对于贴壁细胞：

按常规的方法用胰酶消化贴壁细胞，并收集细胞。用PBS洗涤一次，吸尽上清后，按照每200万细胞加入50微升裂解液的比例加入裂解液，重悬沉淀，冰浴裂解30min，其间涡旋振荡3~4次，每次10s；或冻融2~3次。下转第3步进行实验。

c、对于组织样品：

每50mg固体组织置于培养皿中，手术剪剪碎成3mm $\times$ 3mm左右的小块，加入50 μ l冰冷裂解液工作液，在冰浴上用玻璃匀浆器匀浆。然后把匀浆液转移到1.5ml离心管中，冰浴再裂解5分钟。下转第3步进行实验。

3、4 $^{\circ}$ C 离心（12, 000rpm， 10~15min）。

4、小心吸取上清（含裂解的蛋白质）转移至新的管中，并放置冰上待用。

5、立即测定caspase 8的酶活性或-70 $^{\circ}$ C保存样品，同时可以取少量样品用Bradford法测定蛋白浓度，如果细胞较小，可以适当增加细胞的用量。

6、Caspase 8酶活性的检测：

- a、取出适量的Ac-IETD-pNA和2 $\times$ 反应液，置于冰浴上备用。
- b、使用前每50 μ l 2 $\times$ 反应液加入0.5 μ l DTT。
- c、吸取50 μ l含100~200 μ g蛋白的细胞或组织裂解上清；如体积不足50 μ l用裂解液补足至



总体积50 μ l（各组均采用同样的蛋白量进行测定和比较）。

d、如下设置反应体系：

	空白对照	样品
2 $\times$ 反应液	50 μ l	50 μ l
裂解液	50 μ l	0 μ l
待测样品	0 μ l	50 μ l
Ac-IETD-pNA	5 μ l	5 μ l
总体积	105 μ l	105 μ l

e、加入Ac-IETD-pNA后混匀，注意避免在混匀时产生气泡。37 $^{\circ}$ C孵育4hr。发现颜色变化比较明显时即可测定A₄₀₅。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。

f、用酶标仪或分光光度计（100 μ l的比色皿）在 λ =405nm或400nm测定其吸光值。

g、通过计算OD_{诱导剂}/OD_{阴性对照}的倍数来确定凋亡诱导剂组Caspase-8活化程度。

7、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 $^{\circ}$ 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可以剪切1nmol Ac-IETD-pNA 产生1nmol 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0.2mM，此时底物是饱和的，对于许多样品而言在37 $^{\circ}$ 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。