

Caspase-8活性测定试剂盒

产品货号: BA1982

产品规格: 20T/50T/100T

产品简介:

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。

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。

产品组成:

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

溶液的配制:

1. 试剂一: 分装-20℃保存。
2. 试剂二: 分装-20℃保存。
3. 标准液: 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)。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、100 μ L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 (仅供参考):

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内, 离心后弃上清; 按照细胞数量 (约 10^6 个) 加100 μ L试剂二 (若裂解不充分可提高至150-200 μ L), 震荡重悬沉淀, 置冰上静置15min, 4℃, 15000g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, 蒸馏水调零。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- 临用前用标准品稀释液将5mmol/L pNA标准品稀释至200、100、50、25、12.5、0 μ mol/L的标准溶液待用。
- 样本测定（在96孔板/EP管中按顺序加入以下试剂）

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℃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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{空白管}$ 。			立即测定405nm下吸光度

三、Caspase-8活性计算

1. 标准曲线的建立：

根据标准管的浓度（x， μ mol/L）和 ΔA 标准（y，减去浓度为0的空白管）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 = $(\text{实验处理组} A_{测定} - A_{空白管}) / (\text{实验对照组} A_{测定} - A_{空白管}) \times 100\%$

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℃ 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）= $x \times V_{反总} \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T \times 10^3 = 2x \div C_{pr} \div T$

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：

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com