

## Elabscience® Caspase 8 Activity Assay Kit (Colorimetric Method)

货号: E-CK-A388

规格: 20 Assays/50 Assays/100 Assays

### 产品组分

| 产品编号       | 产品名称                  | 20 Assays | 50 Assays | 100 Assays | Storage                  |
|------------|-----------------------|-----------|-----------|------------|--------------------------|
| E-CK-A38A  | Cell Lysis Buffer     | 10 mL     | 25 mL     | 50 mL      | -20 °C                   |
| E-CK-A38B  | 2×Reaction Buffer     | 10 mL     | 25 mL     | 50 mL      | -20 °C                   |
| E-CK-A388C | Ac-IETD-pNA<br>(4 mM) | 100 μL    | 250 μL    | 500 μL     | -20 °C,<br>shading light |
| E-CK-A38D  | pNA (10 mM)           | 200 μL    | 500 μL    | 1 mL       | -20 °C,<br>shading light |
| 说明书        | 一份                    |           |           |            |                          |

### 产品简介

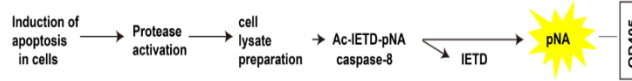
Elabscience®自主研发的 Caspase 8 Activity Assay Kit 采用分光光度法, 可用于检测细胞、组织裂解液或其它样品的 caspase 8 活性。

### 背景介绍

Caspase 8 又名 FLICE、MACH 和 Mch5, Caspase 8 可以自我活化, 也可以在颗粒酶 B 的剪切下活化。Caspase 8 特异性识别的序列是 IETD, 活化的 caspase 8 不但可以剪切 PARP, 而且还参与其它 ICE 家族蛋白酶, 如 caspase 3 和 caspase 7 的活化过程。

### 检测原理

本 caspase 8 活性检测试剂盒是基于 caspase 8 可以催化底物 Ac-IETD-pNA 产生黄色的 pNA(p-nitroaniline), pNA 在 405nm 附近有强吸收, 从而可以通过测定吸光度来检测 caspase 8 的活性。



### 检测样本类型

细胞样本     组织样本

### 保存条件

-20 °C 可保存一年。Ac-IETD-pNA (4 mM) 应适当分装并避免光保存, 避免反复冻融。

### 自备试剂及仪器

#### 1. 试剂

PBS、蛋白定量试剂盒 (Bradford 法)。

#### 2. 仪器

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、恒温培养箱、移液器、研钵或匀浆器。

### 注意事项

1. 所有待检样本都需检测蛋白浓度, 由于样本裂解液中含有还原剂, 不适合使用 BCA 法进行蛋白浓度测定, 推荐使用考马斯亮蓝法 (Bradford 法)。
2. 建议在正式实验前, 选择 2~3 个预期差异大的样本进行预实验, 若样本吸光值超过标准曲线的测量范围, 则需稀释样本或者调整上样量再进行测定。
3. 进行 caspase 8 活性测定的样本, 其蛋白浓度应在 1~4 mg/mL, 否则会影响实验结果的准确性。
4. 一次实验的细胞数目建议不低于  $1 \times 10^6$  个, 组织样本不低于 50mg, 以便达到 1~4 mg/mL 的蛋白浓度。否则会影响实验的精准度, 导致蛋白浓度过低, 反应体系内活性 caspase 8 过少而 OD 值偏低。

### 准备工作

1. Cell Lysis Buffer 溶解后混匀, 冰浴备用。
2. 2×Reaction Buffer 溶解后混匀, 冰浴备用。
3. Ac-IETD-pNA 和 pNA 溶解后混匀, 冰浴备用。

### 样本准备

#### 1. 细胞样本

按照常规方法收集细胞沉淀, PBS 重悬细胞并计数,  $600 \times g$  离心 5 min, 弃上清, 按照每 100 万细胞加入 100 μL Cell Lysis Buffer 的比例加入预冷的 Cell Lysis Buffer 重悬细胞, 在冰浴条件下裂解 30 min, 裂解期间需涡旋震荡 3~4 次, 每次 10 s。裂解后的样本, 于 4 °C,  $11000 \times g$  离心 10~15 min, 小心地吸取上清至新的 EP 管中, 并置于冰上待用。同时使用 Bradford 法 (E-BC-K168-M) 测定蛋白浓度。

**注: 检测贴壁细胞时, 需收集诱导后产生的悬浮细胞, 并与后续收集的贴壁细胞一起检测。**

#### 2. 组织样本

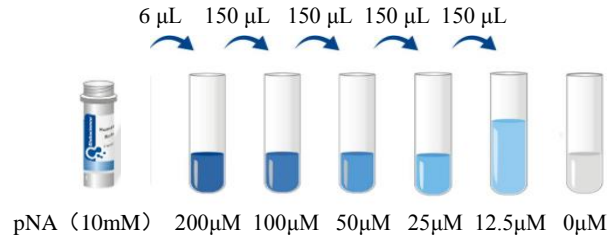
取 50 mg 待测组织样本, 用 PBS 或者生理盐水清洗 1~2 次, 去除组织中残留的血细胞, 用手术剪剪碎, 加入 200 μL 预冷的 Cell Lysis Buffer, 进行匀浆 (在冰浴条件下进行, 若组织质量加倍时, 加入的预冷 Cell Lysis Buffer 也需加倍)。将匀浆好的样本转移至 1.5 mL 离心管中, 冰浴裂解 30 min。裂解后的样本, 于 4 °C,  $11000 \times g$  离心 10~15 min, 小心地吸取上清至新的 EP 管中, 并置于冰上待用。同时使用 Bradford 法 (E-BC-K168-M) 测定蛋白浓度。

**注: 制备好的样本应立即测定, 若无法及时测定, 可将裂解后的上清保存在 -80 °C, 2 周内进行检测。**

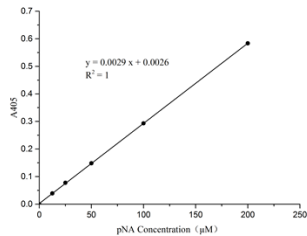
### 实验步骤

#### 1. 制备 pNA 标准曲线 (选做)

- 1) 配制标准品稀释液: 取冰浴的 Cell Lysis Buffer 和 2×Reaction Buffer, 按照 1:1 配制标准品稀释液, 涡旋或吹打混匀。
- 2) 进行倍比稀释: 取 6 支 EP 管, 第一支 EP 管中加入 294 μL 标准品稀释液, 其他每管中加入 150 μL 标准品稀释液, 从 pNA (10 mM) 的标准品中吸取 6 μL 到第一支 EP 管中混匀配成 200 μM 的标准品工作液, 吸取 150 μL 到第 2 支 EP 管, 混匀后吸取 150 μL 到第 3 支 EP 管, 按此步骤往后续依次吸取混匀至第 5 支 EP 管, 如下图所示:



- 每管取 100 μL 不同浓度的标准品置于酶标板或比色皿中, 检测 405 nm 下 OD 值。(为保证实验结果的准确性, 建议所有的待测样本和标准品都设立复孔。)
- 绘制标准曲线: 分别以标准品浓度和对应绝对 OD 值 (每一个标准品的 OD<sub>405</sub> 减去不含 pNA 的 OD<sub>405</sub>) 作为 x 轴和 y 轴, 使用图形软件 (或 EXCEL) 绘制标准曲线, 如下图所示。实测数据可能因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。



## 2. Caspase 8 的活性检测

- 取 50 μL 样本裂解液, 按照下表设置反应体系。

|                   | 空白孔    | 样本孔    |
|-------------------|--------|--------|
| Cell Lysis Buffer | 50 μL  | 0 μL   |
| 2×Reaction Buffer | 45 μL  | 45 μL  |
| 待测样品              | 0 μL   | 50 μL  |
| Ac-IETD-pNA       | 5 μL   | 5 μL   |
| 总体积               | 100 μL | 100 μL |

注意: 在设置反应体系时, 先加入反应液, 再加入待测样本后适当混匀, 最后加入 Ac-IETD-pNA 并混匀, 所有加液步骤注意避免气泡产生。

- 加入 Ac-IETD-pNA 后混匀, 37℃ 孵育 1~2 h, 发现颜色变化较明显时即可检测 OD<sub>405</sub>。若颜色变化不明显, 可适当延长孵育时间到 4 h。

## 结果计算

方法一: 按照酶活性增加的百分比计算

$$\text{Caspase 8 活性百分比} = \frac{\text{OD}_{\text{样本}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}}{\text{Cpr}_{\text{样本}}} \div \frac{\text{OD}_{\text{阴性}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}}{\text{Cpr}_{\text{阴性}}} \times 100\%$$

注: 阴性对照为不做凋亡处理的生物学对照组。

方法二: 按照酶活计算

- 建立标准曲线: 根据标准管的浓度 (x, μmol/L) 和吸光度 (y, 减去浓度为 0 的空白管) 做标准方程  $y=ax+b$ 。
- 计算 caspase 8 酶活力:  
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℃ 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 1 nmol Ac-IETD-pNA 产生 1 nmol 游离的 pNA 的 caspase 8 的酶量。

$$\text{Caspase 8 activity (U/mgprot)} = \frac{\Delta A - b}{a} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} \times f$$

注:

y: 标准品测定 OD 值-空白 OD 值

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA: 测定孔 OD 值-空白孔 OD 值

V<sub>反应</sub>: 反应体系总体积, 0.1 mL

V<sub>样</sub>: 加入的样本体积, 0.05 mL

T: 反应时间, h

Cpr: 样本加入检测体系前的蛋白质浓度, mgprot/mL

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

## 常见问题及解决方案

| 现象                        | 可能原因             | 建议   |
|---------------------------|------------------|--|
| OD <sub>405</sub> 值偏低或无信号 | 药物不激活 caspase 8。 | 并非所有的细胞凋亡都可以检测到 caspase 8, 可设置药物处理时间梯度, 或者根据常见的阳性对照模型设置对照检测。 |
|                           | 细胞诱导时的密度太大。      | 降低诱导时细胞的密度, 摸索最佳诱导密度, 推荐诱导液浓度为 $5 \sim 10 \times 10^5$ /mL。  |

|                           |   |  |
|---------------------------|---|--|
| OD <sub>405</sub> 值偏低或无信号 | 细胞数目太少, Cell Lysis Buffer 太多。                   | 增加细胞的数量, 每 100 万细胞加入 50~100 μL Cell Lysis Buffer。                      |
|                           | 检测总蛋白量较低。                                       | 使用 Bradford 法测浓度, 提高蛋白检测的总量, 可以进行预实验检测, 检测总蛋白不低于 50ug。                 |
|                           | 温度较高, Cell Lysis Buffer 中的 DTT 失活, Caspase 酶失活。 | Cell Lysis Buffer 和细胞裂解过程在冰上进行, 每 10 分钟进行涡旋混匀一次, 充分保证酶活。               |
|                           | 细胞沉淀的保存条件不佳, 导致细胞降解, Caspase 酶失活。               | 收集细胞沉淀后立即放入 -20℃ (1 个月) 或者 -80℃ (2 个月) 保存备用, 规定时间内进行检测。                |
|                           | 波长范围选择错误。                                       | 最佳检测波长为 405nm, 若仪器不符合, 可选择 405±20 nm 范围。                               |
| OD <sub>405</sub> 值偏高     | 37℃ 孵育时间过长。                                     | 适当延长 37℃ 孵育时间, 建议最佳孵育时间为 1~2 小时内, 随着时间延长, control 组的背景数值会逐渐增大, 导致结果偏低。 |
|                           | 细胞处理试剂或者药物有颜色, 且在 405 nm 波长有吸收峰。                | 增加细胞离心洗涤的次数, 设置细胞处理试剂的空白对照, 最终实验结果减去药物试剂的影响。                           |
|                           | 检测样本中有较多气泡。                                     | 排除气泡后再检测。  |
|                           | 使用回收的 96 孔板中有杂质附着, 导致结果偏高。                      | 建议使用新的一次性 96 孔板。   |

## 声明

- 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
- 请注意安全事项, 遵守实验室试剂操作规范操作。
- 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℃ 水浴温育片刻至全部融解后使用。
- 样品中激活的 caspase 水平较低时, 首先确认凋亡现象是否明显。如果细胞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 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。具体的诱导时间需根据具体情况而定。
- 在本试剂盒的反应体系中, 底物的起始浓度为 0.2 mM, 对于绝大多数样品来说, 在 37℃ 孵育 2 个小时以内底物都是饱和的, 针对少数样品中 caspase 8 酶活力特别高的情况, 须用 Cell Lysis Buffer 适当稀释样品后再进行检测。