

Caspase-8 活性分析试剂盒（比色法）

货号: KTA3025

规格: 20 T/50 T/100 T

批号: 见产品标签

	适用样本: 细胞、动物组织
	保质期: -20℃, 避光保存 12 个月

01 背景与原理

Caspases (Cysteine-requiring Aspartate Protease) 是一类蛋白酶家族, 在细胞凋亡、坏死和炎症中发挥着重要作用。根据功能不同, 哺乳动物 Caspases 可分为三类: 起始 Caspases (包括 Caspase-2、8、9 和 10), 负责启动凋亡级联反应; 执行 Caspases (包括 Caspase-3、6 和 7), 负责直接切割细胞内的多种靶蛋白, 导致细胞凋亡的特征性变化, 如 DNA 片段化、细胞膜起泡等; 炎症 Caspases (Caspase-1、4、5、11 和 12), 主要参与炎症反应, 通过激活细胞因子 (如 IL-1 β 和 IL-18) 来调节免疫反应。Caspase-8, 也称为 FLICE, MASH 和 Mch5, 由细胞表面的死亡受体 (如 Fas/CD95、TNF- α 受体) 介导激活, 激活的 Caspase-8 可以进一步切割其他下游的 Caspase (如 Caspase-3 和 Caspase-7), 启动细胞凋亡的级联反应。

Caspase-8 活性分析试剂盒 (比色法) 为检测 Caspase-8 活性提供了一种简便而快捷的方法。该方法基于 Caspase-8 对标记底物 Ac-IETD-pNA (N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroanilide) 的水解作用, 从而释放出黄色的 pNA (对硝基苯胺) 部分。释放的 pNA 在 405 nm 处具有最大吸收峰 ($\epsilon_{\text{mM}}=10.5$), 其浓度可通过在 405 nm 处测量吸光度值, 或通过使用 pNA 染料标准品绘制的标准曲线来计算, 检测可使用酶标仪完成。

02 包装清单

试剂盒组分	规格			储存要求
	20 T	50 T	100 T	
Cell Lysis Buffer	5 mL	10 mL	20 mL	4℃
Reaction Buffer (2×)	10 mL	20 mL	40 mL	4℃
Ac-IETD-pNA (4 mM)	100 μ L	250 μ L	500 μ L	-20℃, 避光保存
pNA (10 mM)	100 μ L	250 μ L	500 μ L	-20℃, 避光保存
DTT (100×)	150 μ L	400 μ L	750 μ L	-20℃

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪、低温离心机、制冰机	酶标仪需能检测 405 nm 处的吸光度
耗材	细胞培养孔板	普通 96 孔细胞培养板
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）去离子水	配液、清洗
其他	可调节式移液枪及枪头、匀浆器	组织样本需用到匀浆器

04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Working Cell Lysis Buffer	临用前配置，1 mL Cell Lysis Buffer 加 10 μ L DTT（100 $\times$ ）。配置完置于冰上，未用完试剂舍弃。	
Working Reaction Buffer	临用前配置，用去离子水将 Reaction Buffer（2 $\times$ ）稀释至 1 $\times$ ，再每 1 mL Reaction Buffer（1 $\times$ ）加 10 μ L DTT（100 $\times$ ）。	配置完置于冰上，未用完试剂舍弃。
Ac-IETD-pNA（4 mM）	即用型；使用前，置于冰上。	未用完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 避光保存，避免反复冻融。
pNA（10 mM）	即用型；使用前，置于冰上。	未用完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 避光保存，避免反复冻融。
DTT（100 $\times$ ）	即用型；使用前，置于冰上。	未用完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 避光保存，避免反复冻融。
Standard 设置	按标准品配置表所示，用 Working Reaction Buffer 将标准品 pNA（10 mM）稀释为不同浓度的标准溶液。	每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

05-1-2 标准品配制

使用 Working Reaction Buffer 将标准品 pNA (10 mM) 稀释为 200、100、50、25、12.5、0 μM 的标准溶液。

序号	标准品体积	Working Reaction Buffer (μL)	标准品浓度 (μM)
Std.1	6 μL pNA (10 mM)	294	200
Std.2	150 μL of Std.1 (200 μM)	150	100
Std.3	150 μL of Std.2 (100 μM)	150	50
Std.4	150 μL of Std.3 (50 μM)	150	25
Std.5	150 μL of Std.4 (25 μM)	150	12.5
Std.6	0	150	0

05-2 样本制备

注意：我们建议使用新鲜样品。或按照“样本制备”将样品保存在 -80°C 。使用前，在冰上解冻，这可能会影响样品的稳定性，并且读数可能会低于预期。此试剂盒可检测蛋白水解活性。在样品制备步骤中请勿使用蛋白酶抑制剂，它可能会干扰测定。

细胞凋亡阳性诱导：选择合适的方法诱导细胞凋亡，同时，建议对每个 Caspase-8 比色测定设置不诱导的对照培养。

1. 样本处理：

(1) 对于贴壁细胞：胰蛋白酶消化后收集细胞。600 g, 4°C 离心 5 min，小心吸去上清液。用 1 mL PBS 洗涤细胞 2 次。离心后，去除上清液。在 50 μL Working Cell Lysis Buffer 中重悬 $1-5 \times 10^6$ 个细胞。

(2) 对于悬浮细胞：600 g, 4°C 离心 5 min，小心吸去上清液。用 1 mL PBS 洗涤细胞 2 次。离心后，去除上清液。在 50 μL Working Cell Lysis Buffer 中重悬 $1-5 \times 10^6$ 个细胞。

(3) 对于组织：将 5-20 mg 组织切成小块，用 PBS 清洗组织，加入 0.1 mL Working Cell Lysis Buffer，冰浴匀浆。

2. 裂解物冰上孵育 15-20 min。

3. 16000 g, 4°C 离心 15 min，然后将上清液转移至新试管中，置冰上待测。

4. 立即测定 caspase-8 的酶活性或 -80°C 保存样品。同时可以取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度。

注意：如需测定蛋白浓度，推荐使用 Abbkine 货号：KTD3002 的蛋白质定量试剂盒（Bradford 法）进行样本蛋白质浓度测定。

05-3 实验步骤

- 1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 405 nm。
- 2. 操作表（下述操作在 96 孔板中操作）：

	空白孔 (μL)	测定孔 (μL)	对照孔 (μL)	标准孔 (μL)
Working Reaction Buffer	100	50	55	0
Standard	0	0	0	100
上清	0	50	50	0
Ac-IETD-pNA (4mM)	5	5	0	0

立即检测 405 nm 处吸光值，计算 $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标}} - A_{\text{Std.6}}$ ， $A_{\text{Std.6}}$ 为不含 pNA 的标准孔的吸光值。

混匀，37℃ 孵育 1-2 h，检测 405 nm 处吸光值。空白孔记为 $A_{\text{空}}$ ，测定孔记为 $A_{\text{测}}$ ，对照孔记为 $A_{\text{对}}$ 。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测}} - A_{\text{空}}$ 。仅组织样本需要设置对照孔，对于组织样本， $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测}} - A_{\text{对}}$ 。

注意：

- 1) 空白孔和标准孔只需测定 1-2 次。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验；
- 2) 对于组织样本，样本本身有颜色，需要设置对照孔，细胞样本一般不需要设置对照孔；
- 3) 在反应体系中，适当混匀，注意避免在混匀时产生气泡；
- 4) 发现颜色变化比较明显时即可测定 405 nm 的波长。如果颜色变化不明显，可以适当延长孵育时间至 4 h。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)进入“技术中心”查找“在线计算器”工具。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 按标准曲线计算

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线 $y=kx+b$ 。将样本的 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y 值 (μM)。

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 $A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}}$)/(实验对照组 $A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}}$)×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°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 一个小时内可以剪切 1 nmol pNA 底物产生 1 nmol 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。

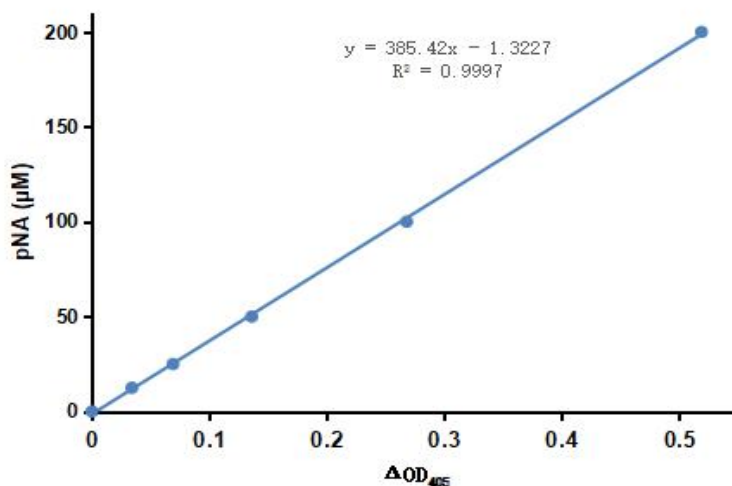
$$\text{Caspase-8 活性 (U/mg prot)} = y \times V_{\text{反应总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 = 2.1 \times y \div \text{Cpr} \div T$$

$V_{\text{反应总}}$ ：反应体系总体积，0.105 mL = 1.05×10^{-4} L； $V_{\text{样}}$ ：加入的样本体积，0.05 mL；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 μmol = 10^3 nmol。

注意：对于样品中 **caspase-8** 酶活力特别高的情况，须用 **Working Cell Lysis Buffer** 适当稀释样品后再进行测定。计算时再乘以稀释的稀释倍数 n 。

07 结果示例

典型标准曲线： $y = 385.42x - 1.3227$ ， $R^2 = 0.9997$



示例-1：收集 1×10^7 个 HEK293 细胞，加入 500 μL Working Cell Lysis Buffer，按照测定步骤操作，37°C 孵育 1 h 后用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测}} - A_{\text{空}} = 0.321 - 0.054 = 0.267$ ，蛋白浓度为 11.84 mg/mL，将 $\Delta A_{\text{测}}$ 代入标准曲线方程，得到 $y = 101.6$ ，Caspase-8 活性 (U/mg prot) = $2.1 \times y \div \text{Cpr} \div T = 2.1 \times 101.6 \div 11.84 \div 1 = 18.02$ U/mg prot。

08 FAQ

1. 请问细胞有红色或绿色荧光会有影响吗？

理论上没有影响的。

2. Caspase 试剂盒里面标准品 pNA 必须做吗？

样本的酶活需要根据生成的 pNA 的量来确定的，而样本中 pNA 的生成量需要根据标曲方程计算获得，因此必须要绘制标准曲线。

3. 测定出的 A405 过高或者样品量不足

在反应体系中可适当减少样品的用量，用细胞裂解液补足至总体积 50 μL 再检测。

4. 测定出的 A405 过低

1) 样品中蛋白含量太低，裂解样品时需设法使样品中的蛋白浓度至少达到 1-3 mg/mL。

2) 样品中激活的 Caspase 水平很低。首先确认凋亡现象是否明显，如果凋亡比较明显并且确认该 Caspase 是可以被激活的，可以适当调节诱导细胞凋亡的时间，找到 Caspase 激活比较强的时间点，这样就可以检测出该 Caspase 的激活。可以作酶活一时间曲线，具体诱导凋亡时间需根据具体情况而定。

5 . 孵育时间延长至 4 h 颜色依然不明显可以继续延长吗？

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。

6 . 该试剂盒的的细胞裂解液可以和其他 Caspase 活性检测试剂盒的细胞裂解液通用吗？

本公司 Caspase 系列试剂盒的细胞裂解液可以通用。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA3020	Caspase-1 活性分析试剂盒（比色法）
KTA3023	Caspase-4 活性分析试剂盒（比色法）
KTA3024	Caspase-6 活性分析试剂盒（比色法）

Caspase-8 活性分析试剂盒（比色法）

(Abbkine 货号: KTA3025)

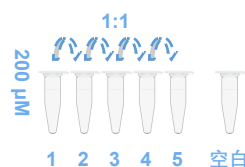
样本制备

细胞凋亡阳性诱导,并设置不诱导的对照



4°C, 16000 g 离心 15 min

取上清至新离心管中
置冰上待测



标准品配制

试剂准备

Working Cell Lysis Buffer: 每 1 mL Cell Lysis Buffer 加 10 μL DTT (100 $\times$)

Working Reaction Buffer: 用去离子水将 Reaction Buffer (2 $\times$) 稀释至 1 $\times$, 再每 1 mL Reaction Buffer (1 $\times$) 加 10 μL DTT (100 $\times$)

在 96 孔板中进行下列操作



空白孔

Working Reaction Buffer 100 μL
Ac-IETD-pNA (4 mM) 5 μL



测定孔

Working Reaction Buffer 50 μL
上清 50 μL
Ac-IETD-pNA (4 mM) 5 μL



对照孔

Working Reaction Buffer 55 μL
上清 50 μL
注意: 仅组织样本需要设置对照孔



标准孔

Standard 100 μL
注意: 需立即检测标准孔 405 nm 处吸光度

混匀, 37°C 孵育 1-2 h

数据检测

测定 405 nm 吸光度
结果计算