

## 产品组成:

规格	20 assays	50 assays	100 assays
裂解缓冲液	5ml	10ml	15ml
Ac-IETD-pNA	200ul	500ul	1ml
检测缓冲液	5ml	10ml	15ml
DTT	100ul	150ul	250ul

**储存条件:** 裂解缓冲液和检测液室温保存; 其他-20℃避光保存。

**有效期:** 一年。

## 注意事项:

- Ac-IETD-pNA 避光保存, 使用过程中尽量避免。
- Ac-IETD-pNA 溶液冻存后可能产生沉淀, 使用前请混匀。

## 产品简介:

Caspase 8 活性检测试剂盒 (Caspase 8 Activity Assay Kit) 是采用分光光度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 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。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, pNA 在 405nm 附近有强吸收, 从而可以通过测定吸光度来检测 caspase 3 的活性。本试剂盒用酶标仪检测或容量不超过 100  $\mu$ l 的分光光度检测杯检测, 可用于培养细胞或新鲜组织样本的 caspase-8 检测。

## 使用方法:

### 一、裂解缓冲液和检测缓冲液配制

根据待测样品数准备裂解缓冲液和检测缓冲液, 每 1ml 缓冲液中加入 10ul DTT。

### 二、样品处理

#### A. 细胞样品

1. 收集  $2-5 \times 10^6$  个细胞, 在 4℃, 500×g 条件下离心 2-3 分钟, 小心吸取培养基, 尽可能吸干, 收集细胞。
2. 用冷 PBS 洗涤细胞两次, 每次洗涤后尽可能吸干上清。
3. 在细胞中加入 100 $\mu$ l 冷的裂解缓冲液, 高速涡旋振荡 15 秒。
4. 置冰上 15 分钟, 每隔 5 分钟高速涡旋振荡 15 秒。
5. 在 4℃, 500×g 条件下离心 5 分钟。
6. 快速将上清吸入另一预冷的干净离心管, 置于冰上或-80℃冰箱保存备用。

#### B. 组织样品

1. 取适量组织样本剪碎, 按照 50mg/100 $\mu$ l 冷的裂解缓冲液, 用组织匀浆器匀浆至无明显肉眼可见固体(或用液氮研磨), 冰上静置 15 分钟, 小心将上清吸入另一预冷的干净离心管。
2. 在 4℃, 500×g 条件下离心 5 分钟。

3. 快速将上清吸入另一预冷的干净离心管，置于冰上或-80℃冰箱保存备用。

三、对上述处理过的上清用 Bradford 法进行蛋白定量。

#### 四、Caspase 8 活性检测

- 1、取 10ul 大约含 20-50ug 蛋白的裂解上清，加入 90ul 检测缓冲液。
- 2、再加入 10ul Ac-IETD-pNA（使用前请混匀），在 37℃下避光反应 1-2 小时，有黄色颜色产生即可进行检测，如果颜色变化不明显，时间可以延长，甚至孵育过夜。部分样品中激活的 caspase-8 水平较低，颜色变化不明显，直接上机检测，与对照组样品产品变化即可。
- 3、测定 A405nm 或 A400nm。
- 4、根据凋亡诱导的细胞的吸光值与空白对照细胞的吸光值的比值计算相对的 Caspase 8 活性程度。