

Caspase-8 Colorimetric Assay Kit

产品描述

含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶（Caspase）是一个半胱氨酸蛋白酶家族，在细胞凋亡、坏死和炎症中起重要作用。Caspase的连续激活在细胞凋亡中起重要作用。Caspase-8是一种Caspase蛋白，可切割和激活Caspase-3并参与Fas和其他凋亡刺激诱导的程序性死亡。Caspase-8可以在亨廷顿病患者大脑受影响区域的不溶性部分检测到，说明Caspase-8可能在神经退行性疾病中发挥关键作用。

Caspase-8 Colorimetric Assay Kit为检测IETD依赖性Caspase活性提供了一种方便且简单的方法。当Caspase-8或相关的半胱天冬酶从标记的底物IETD-p-硝基苯胺（IETD-pNA）上裂解IETD时，可以使用酶标仪或分光光度计在405 nm或400 nm处测量游离pNA的光吸收。将凋亡样品中游离pNA的吸光度与未诱导的对照进行比较，确定Caspase-8活性的增加倍数。

组分和储存条件

Components	K2013-25 25 Assays	K2013-100 100 Assays	K2013-200 200 Assays	K2013-400 400 Assays
Cell Lysis Buffer	25 mL	100 mL	100 mL	100 mL
2X Reaction Buffer	2 mL	4 X 2 mL	16 mL	32 mL
IETD-pNA (4 mM)	125 μ L	500 μ L	2X 0.5 mL	2X 1 mL
DTT (1 M)	100 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L

-20°C 保存。

实验操作

***Note:** 实验前准备: 用2X Reaction Buffer将DTT稀释至终浓度10mM（10 mM终浓度: 每1 mL的2X Reaction Buffer添加10 μ L 1.0 M DTT储备液）。解冻后, 将Cell Lysis Buffer和2X Reaction Buffer保存于4°C。IETD-pNA注意避光。

1. 用适当方法诱导细胞凋亡, 同时孵育无诱导的对照培养物。
2. 离心并沉淀 $1-5 \times 10^6$ 个细胞。
3. 用50 μ L冷冻的细胞裂解缓冲液重悬细胞。
4. 在冰上孵育细胞20 min。
5. 在离心机（10000 x g）中离心1 min。
6. 将上清液（胞质提取物）转移至新试管中, 置于冰上立即测定或分装并保存在-80°C备用。

7. 测定蛋白质浓度。
8. 向每个样品中加入50 μL 的2X Reaction Buffer (含10 mM DTT)。
9. 加入5 μL 4 mM IETD-pNA底物 (终浓度200 μM)，37°C孵育1-2h。
10. 使用透明酶标板在酶标仪中使用400 nm或405 nm读取数据。也可以使用100 μL 微型石英比色皿 (Sigma)在分光光度计中读取样品(400 nm或405 nm处)。Caspase-8活性的增加倍数可以通过将这些结果与未诱导的控制水平进行比较来确定。

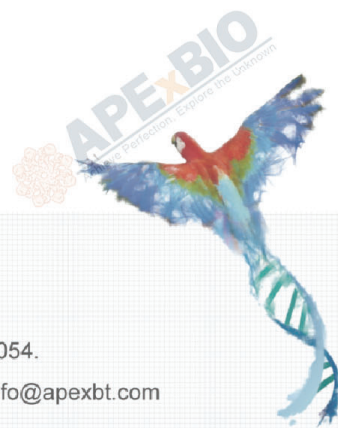
***Note:** 在计算Caspase-8活性的倍数增加之前，应从诱导和未诱导样品的读数中减去细胞裂解物和缓冲液背景读数的背景读数。即设置 blank 组 (不加入 IETD-pNA 的底物)。

■ 注意事项

问题	原因	解决方案
实验无结果	<ul style="list-style-type: none"> • 样品未完全裂解 • 实验未在诱导凋亡后的最佳时间进行 • 以错误波长读取样品信号 • 使用不新鲜的 DTT 	<ul style="list-style-type: none"> • 在裂解缓冲液中重悬细胞沉淀并按照数据表中的说明进行孵育 • 进行时程诱导细胞凋亡实验 • 检查数据表中列出的波长和仪器的过滤器设置 • 始终在细胞裂解缓冲液中使用新鲜解冻的 DTT
背景高	<ul style="list-style-type: none"> • 细胞裂解液用量增加 • 因移液操作不当导致组分量增加 • 细胞样本的孵育时间过长 • 试剂盒过期或试剂保存不当 • 细胞污染 	<ul style="list-style-type: none"> • 参考数据表并使用建议的细胞量制备裂解物 • 使用校准过的移液器 • 请参阅数据表并了解准确的孵育时间 • 始终检查有效期并适当地存放各个组分 • 检查细菌/酵母/支原体污染
信号低	<ul style="list-style-type: none"> • 细胞未启动细胞凋亡 • 用于分析的细胞数量非常少 • 使用长期保存的样品 • 用于读取样本的设备设置不正确 • 试剂在冰上放置较长时间 	<ul style="list-style-type: none"> • 确定诱导后启动细胞凋亡的时间点 (时程实验) • 请参阅数据表选择适当的细胞量 • 使用新鲜样品或等分试样，并在一个月内储存和使用以进行检测 • 请参阅数据表并使用推荐的滤波器设置 • 使用前一定要解冻并准备新鲜的反应混合物
信号读数不稳定	<ul style="list-style-type: none"> • 每孔中接种的细胞量不均匀 • 在不同缓冲液中制备的样品 • 实验时贴壁细胞脱落并丢失 • 细胞/组织样品未完全均质 • 使用多次冻融后的样品 • 样品中存在干扰物质 • 使用不新鲜或储存不当的样品 	<ul style="list-style-type: none"> • 只接种相同数量的健康细胞 (正确的传代数) • 使用试剂盒中提供的细胞裂解缓冲液 • 轻轻地进行实验，一式两份/一式三份；凋亡细胞可能成为漂浮物 • 使用 Dounce 均质机 (增加冲程次数)；显微镜下观察裂解效率 • 若需要多次使用，等分和冷冻样品 • 根据需要排除故障 • 使用新鲜样品或在正确的温度下储存直至使用

意外数据	<ul style="list-style-type: none"> • 测量波长错误 • 细胞样本含有干扰物质 	<ul style="list-style-type: none"> • 检查设备和过滤器设置 • 排除干扰试剂盒的故障（运行适当控制）
一般问题	<ul style="list-style-type: none"> • 不适当解冻组分 • 孵育时间或温度不当 • 使用体积不当 • 孔/管中形成气泡 • 替换旧试剂盒/批次的试剂 • 使用不同的 96 孔板 	<ul style="list-style-type: none"> • 使用前将所有成分完全解冻并轻轻混合 • 请参阅数据表并选择合适的孵育时间和温度 • 使用校准的移液器并正确分装 • 移液器轻轻靠在孔/管壁上 • 使用同一试剂盒中的新鲜试剂 • 荧光：黑板； 吸光度：透明板

注意：最可能的原因列在每个部分下面。原因可能与其他部分重叠。



APEX BIO Technology

www.apexbt.com

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: info@apexbt.com