

血管紧张素转换酶2(ACE2)活性荧光检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0319S	血管紧张素转换酶2(ACE2)活性荧光检测试剂盒	100次
P0319M	血管紧张素转换酶2(ACE2)活性荧光检测试剂盒	500次

产品简介:

- 碧云天研发的血管紧张素转换酶2(ACE2)活性荧光检测试剂盒(ACE2 Activity Fluorometric Assay Kit), 是一种用荧光法快速高灵敏检测血管紧张素转换酶2 (Angiotensin I Converting Enzyme 2 or Angiotensin II Converting Enzyme, 简称ACE2)活性的试剂盒。
- 2019年底由新型冠状病毒引起的肺炎疫情, 从2020年初开始在全球大流行, 感染病例快速上升, 引发全球关注。该病毒被世界卫生组织(WHO)命名为2019-nCoV, 被国际病毒分类委员会命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)。由新型冠状病毒导致的疾病, 被世界卫生组织命名为2019冠状病毒病疾病 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19), 通常称为新型冠状病毒肺炎, 简称“新冠肺炎”。
- ACE2是一种含锌离子的金属羧肽酶(metalloprotease), 其结构包括一个信号肽、一个跨膜结构域和一个含有HEXXH锌离子结合结构域的金属蛋白酶活性位点。ACE2是人血管紧张素转换酶(Angiotensin I Converting Enzyme, 简称ACE或ACE1)的同源基因, 是在肺、心脏、肾脏和肠等组织中高表达的跨膜糖蛋白, 是肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)的重要成员。ACE2催化Angiotensin I剪切生成九肽的血管扩张剂Ang 1-9, 也可以催化Angiotensin II剪切生成七肽的血管扩张剂Ang 1-7, 在调节血压、体液平衡、炎症、细胞增殖、肥大和纤维化的方面具有重要作用。同时, ACE2的组织和细胞的特异性表达提示其在调节心血管和肾脏功能以及生育方面发挥重要作用。此外, ACE2是冠状病毒SARS-CoV、SARS-CoV-2 (2019-nCoV)以及HCoV-NL63的受体。SARS-CoV及SARS-CoV-2通过其Spike蛋白受体结合域 (receptor binding domain, RBD)与ACE2的肽酶结构域结合, 参与病毒的感染过程。ACE2与SARS-CoV-2 Spike蛋白的亲和力是SARS-CoV Spike蛋白的10-20倍。
- ACE2在新冠病毒引起的疾病中, 扮演了重要而复杂的角色。一方面, ACE2是新冠病毒进入细胞所识别的受体, 在小鼠模型中, ACE2表达水平越高, 感染就会越严重, 因此ACE2起着帮助新冠病毒感染细胞并得以在细胞内复制的“导火线”作用; 另一方面, ACE2有一定的保护作用, 如果使ACE2表达水平降低, 小鼠的肺部损伤就会急剧恶化。因此, ACE2为预防和治疗新冠肺炎提供了新的研究方向, ACE2蛋白作为新冠病毒感染人体、进入细胞的重要靶点已经越来越受到关注。
- 血管紧张素转换酶2(ACE2)活性荧光检测试剂盒采用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法, 其检测原理如下。
- MCA是荧光供体(Donor), Dnp是荧光受体(Acceptor)或称为淬灭基团(Quencher), 这两个荧光基团的吸收光谱有一定的重叠, 当这两个荧光基团间的距离合适时(一般7-10nm), 荧光能量由供体向受体转移, 导致供体荧光分子自身的荧光强度衰减。MCA和Dnp被连接到ACE2蛋白酶的底物(Substrate)的两端。当ACE2没有切割底物时, 两个基团足够接近, 发生荧光共振能量转移, 即Dnp可淬灭MCA的荧光而导致检测不到荧光; 当该底物被ACE2切割后, 多肽的首尾两端分离, 两个基团分开, MCA的荧光不再被Dnp淬灭, 即可检测到MCA的荧光, 这样通过荧光检测就可以非常灵敏地检测ACE2蛋白酶的酶活性。MCA的最大激发波长为325nm, 最大发射波长为393nm。

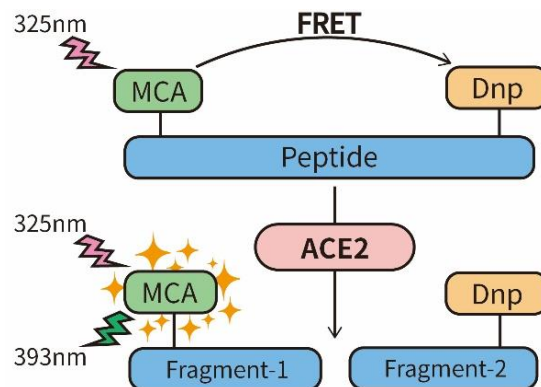


图1. 碧云天血管紧张素转换酶2(ACE2)活性荧光检测试剂盒检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。96孔板中通常1-10 μ l细胞或组织样品足够用于ACE2酶活性检测。
- 本试剂盒使用灵活, 检测速度快, 适用范围广。本试剂盒中提供了ACE2酶阳性对照(Positive Control), 便于检测体系的建

立。本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆以及肺、肠、肝脏等组织或细胞样品的检测。不仅适合少量样品的检测，也非常适合高通量筛选(high-throughput screening)的自动化操作系统。本试剂盒采用一步法检测，简单快速，全程约0.5-1h即可完成。

- 本试剂盒提供的Lysis Buffer通用性强，可直接用于裂解细胞或动物组织样品用于检测ACE2酶活性。
- 本试剂盒内提供了MCA Standard，在0.2-50 μ M范围内有良好的线性关系。可以通过设置标准曲线，计算出样品中ACE2的活性。
- 用于96孔板检测时，本试剂盒小包装P0319S可以进行100次检测，中包装P0319M可以进行500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0319S-1	Lysis Buffer	25ml
P0319S-2	Assay Buffer	20ml
P0319S-3	Positive Control (10X)	20 μ l
P0319S-4	Substrate	200 μ l
P0319S-5	MCA Standard (10mM)	20 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0319M-1	Lysis Buffer	120ml
P0319M-2	Assay Buffer	100ml
P0319M-3	Positive Control (10X)	100 μ l
P0319M-4	Substrate	1ml
P0319M-5	MCA Standard (10mM)	100 μ l
—	说明书	1份

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存，一年有效。其中P0319-4 Substrate、P0319-5 MCA Standard (10mM)需避光保存。

注意事项：

- Assay Buffer、Substrate和MCA Standard (10mM)需完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。Positive Control (10X)使用时应置于冰上，使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 如果使用本试剂盒提供的Lysis Buffer制备样品，并且加入的样品量在本试剂盒的推荐范围内，可以确保反应体系的pH值在适宜的范围内。如果使用自行配制的裂解液，请确保加入样品后反应体系的pH值在6.5-7.0之间，或者确保样品的pH值在6.5-7.0之间，否则可能会影响检测结果的信号值和稳定性。
- 体积较小的试剂首次使用时建议先离心数秒使液体沉降于管底，然后再使用。结冻的试剂必须完全融化并混匀后使用。
- 尽管经测试本试剂盒中的Positive Control (10X)反复冻融5次对活性基本没影响，为取得良好的检测效果，建议第一次使用时适当分装保存。Positive Control (10X)融解后可能会有少量不溶物，属正常现象。尽量充分溶解后，离心取上清使用即可。
- 虽然本试剂盒中的ACE2底物有很高的特异性，但仍然有可能有一些蛋白酶可以切割本底物，建议进一步使用ACE2特异性抑制剂MLN-4760 (SF1197)进行验证。
- 检测时建议使用96孔黑板，推荐选购碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)。
- 细胞、组织等裂解样品如果置于4 $^{\circ}$ C保存，用于ACE2活性检测时，保存的时间不应超过2天，否则会影响检测结果的准确性。通常细胞、组织等裂解样品宜在-20 $^{\circ}$ C保存，-80 $^{\circ}$ C保存更佳。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的准备。

a. 血液样品的准备。

对于血清样品，将全血在常温如25 $^{\circ}$ C下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4 $^{\circ}$ C约1000-2000 \times g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4 $^{\circ}$ C约1000-2000 \times g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。

b. 细胞或组织样品的准备。

对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500 \times g, 5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200 μ l Lysis Buffer的比例加入Lysis

Buffer, 适当吹打, 冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟, 取上清用于后续检测。对于组织样品, 按照每10mg组织加入100μl Lysis Buffer的比例进行匀浆。4°C约12,000×g离心3-5分钟, 取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测, 可以-20°C或-80°C冻存。

2. 试剂盒的准备。

将Assay Buffer、Substrate和MCA Standard等试剂平衡至室温后分别混匀备用。Positive Control (10X)存放于冰浴备用, 使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。

3. 阳性对照的准备。

取适量的Positive Control (10X)并加入Assay Buffer对Positive Control (10X)进行10倍稀释。例如, 取5μl Positive Control (10X), 加入45μl Assay Buffer, 混匀, 即得50μl Positive Control (1X)。96孔板检测时, 通常每孔10μl Positive Control (1X)即可。

4. MCA标准曲线的设置。

取2μl MCA Standard (10mM), 加入198μl Assay Buffer, 混匀, 即为200μl 100μM的MCA溶液, 分别取0、2.5、5、10、20、30、40、50μl的100μM MCA溶液加入96孔板中, 并用Assay Buffer补足至100μl, 此时, MCA标准曲线的各孔MCA浓度和物质的量分别为0、2.5、5、10、20、30、40、50μM或0、0.25、0.5、1、2、3、4、5nmol。也可自行设置适宜的MCA浓度进行标准曲线的设定。

5. 检测体系的设置:

参照下表依次加入试剂盒各组分及样品。初次检测时, 待测样品可以稀释一系列浓度梯度, 以确保最终检测值在标准曲线线性范围内。待测样品的稀释倍数记为dil。

待测样品	空白对照	阳性对照	待测样品
Assay Buffer	88μl	88μl	88μl
Positive Control (1X)	-	10μl	-
Lysis Buffer	10μl	-	-
待测样品	-	-	10μl
总体积	98μl	98μl	98μl

注: 为获得更加可靠的检测结果, 推荐每个样品设置3个复孔。

6. 检测。

a. 振荡混匀1-2分钟, 确保混合充分。

b. 除MCA标准曲线外每孔加入2μl Substrate, 混匀。**注:** 加入Substrate后反应会立即开始, 如果孔数较多的情况下, 建议在低温或使用排枪操作以减小各孔间加入Substrate的时间差而导致的误差, 混匀操作可在培养板振荡器上进行。

c. 混匀后立即使用荧光酶标仪进行荧光测定。设置荧光酶标仪温度为37°C, 激发波长为325nm、发射波长为393nm, 每5分钟或10分钟读取一次数值。

注1: 连续测定的时间可以根据待测样品中ACE2的酶活性进行调整, 但是需确保获得6个点以上的数据。对于ACE2的酶活较高的样品, 建议测定总时间为20分钟或30分钟, 对应的测定间隔时间设为2分钟或5分钟; 对于ACE2的酶活很低的样品, 可以延长测定总时间为1至2小时, 对应的测定间隔时间设为10或20分钟。

注2: 如果荧光酶标仪没有温控功能, 也可以在室温测定, 但这样检测出来的是室温条件下的酶活性, 此时酶活性可能会偏低一些, 不同的实验条件偏低的程度会有所不同。

7. 计算。

a. 计算每个样品孔和空白对照孔的平均荧光值, 可分别记录为RFU空白对照、RFU阳性对照和RFU待测样品。RFU, Relative Fluorescence Unit。选取待测样品组MCA荧光强度呈线性关系的时间点的数据用于分析, 记录呈线性关系的时间间隔为T, 时间间隔T内的荧光强度变化量为ΔRFU, 即ΔRFU= RFU待测样品(Time b) - RFU待测样品(Time a)。

b. 也可以直接比较各个样品在一定时间内的ΔRFU而确定样品的ACE2相对活性, 但须确保最终时间点时RFU读数未达平台。

c. 也可将标准曲线各孔的荧光值减去标准品零浓度孔的荧光值, 建立MCA标准曲线。将ΔRFU代入标准曲线, 即可算出在反应时间内样品中MCA的生成量(记录为A)。MCA的标准曲线请参考图2A, MCA在0.02-5nmol (即0.2-50μM)范围内有良好的线性关系。ACE2蛋白酶活性的计算公式如下:

$$\text{ACE2 Activity (nmol/min/mg或U/mg)} = A \times \text{dil} / (V_{\text{sample}} \times T \times C)$$

注: V_{sample} 为检测时待测样品的体积($V_{\text{sample}}=10\mu\text{l}=0.01\text{ml}$);

A为步骤7c根据标准曲线确定的MCA的生成量(nmol);

dil为步骤5中样品稀释倍数;

C为样品蛋白浓度(mg/ml, 检测步骤参考碧云天的BCA蛋白浓度测定试剂盒或去垢剂兼容型的Bradford蛋白浓度测定试剂盒);

T为步骤7a中反应时间(min)。

酶活力单位的定义为: 温度37°C条件下, 每分钟催化生成1nmol MCA酶量定义为一个单位(Unit, U)。

d. 虽然本试剂盒中的ACE2底物已经比较特异, 但仍然有可能有一些蛋白酶可以切割本底物, 建议进一步使用ACE2特异性抑制剂MLN-4760 (SF1197)进行验证。

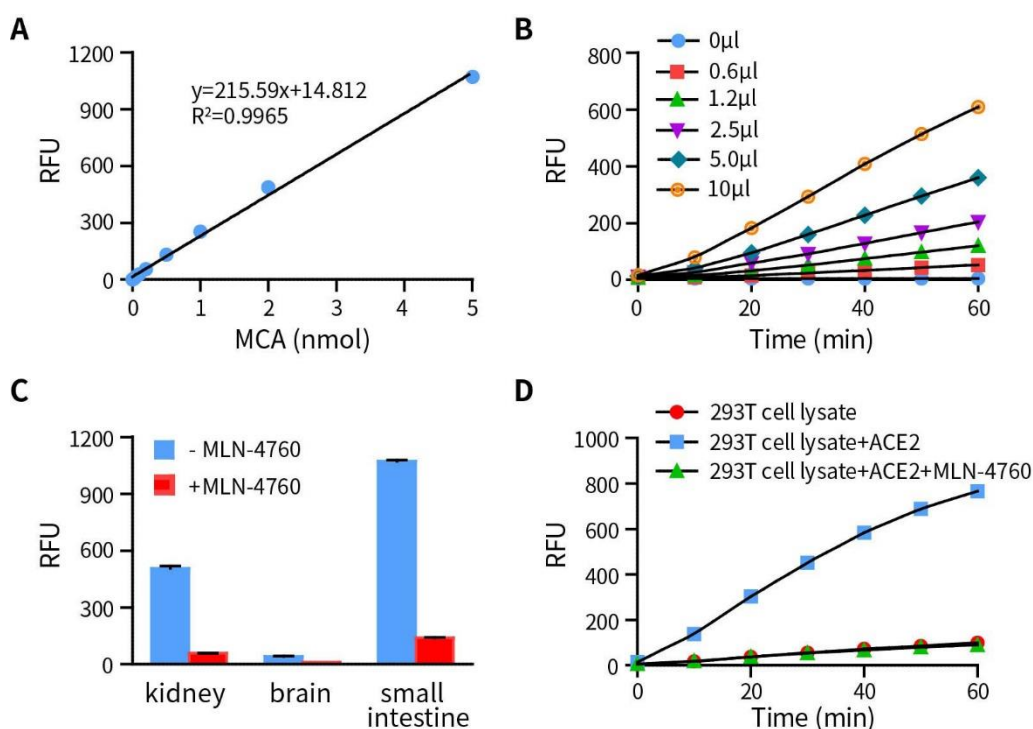


图2. 碧云天血管紧张素转换酶2(ACE2)活性荧光检测试剂盒的MCA标准曲线和对ACE2阳性对照及组织样品的检测效果图。A. 本试剂盒的MCA标准曲线示意图。B. 不同量的ACE2 Positive Control (1X)酶切底物,生成产物的荧光强度示意图。C. 小鼠不同组织的ACE2酶活性检测效果及MLN-4760的抑制效果。总蛋白量都为10µg,抑制剂为MLN-4760 (SF1197),终浓度为500nM)。D. ACE2 Positive Control (1X, 10µl)及抑制剂MLN-4760 (终浓度为500nM)在293T细胞裂解液中的检测效果(总蛋白量为22µg)。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异,图中数据仅供参考。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D8006S	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	100次
D8006M	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	500次
P0312S	新型冠状病毒M ^{pro} /3CL ^{pro} 抑制剂筛选试剂盒	100次
P0312M	新型冠状病毒M ^{pro} /3CL ^{pro} 抑制剂筛选试剂盒	500次
P0313S	冠状病毒M ^{pro} /3CL ^{pro} 活性荧光检测试剂盒	100次
P0313M	冠状病毒M ^{pro} /3CL ^{pro} 活性荧光检测试剂盒	500次
P9731-0.1ml	MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH ₂ (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	20mM×0.1ml
P9731-5mg	MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH ₂ (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	5mg
P9731-25mg	MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH ₂ (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	25mg
P9733-0.1ml	Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	20mM×0.1ml
P9733-5mg	Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	5mg
P9733-25mg	Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	25mg
R0011	Beyozol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0016	Trizol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
R0035S	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	12次

R0035M	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次
R0035L	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	200次
R0036-200µg	Carrier RNA	200µg
R0036-1mg	Carrier RNA	1mg
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0141-100ml	RNALater™病毒RNA稳定保存液	100ml
R0141-500ml	RNALater™病毒RNA稳定保存液	500ml
R0143-100ml	病毒样品常规保存液	100ml
R0143-500ml	病毒样品常规保存液	500ml
R0145-100ml	BeyoDirect™ RNA病毒直接qRT-PCR保存液	100ml
R0145-500ml	BeyoDirect™ RNA病毒直接qRT-PCR保存液	500ml
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	10片
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	10个
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	10个

Version 2020.11.08