

β-Secretase 1 (BACE1)活性荧光检测试剂盒

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|--------------------------------|------|
| P0362S | β-Secretase 1 (BACE1)活性荧光检测试剂盒 | 100次 |
| P0362M | β-Secretase 1 (BACE1)活性荧光检测试剂盒 | 500次 |

产品简介:

- 碧云天研发的β-Secretase 1 (BACE1)活性荧光检测试剂盒(BACE1 Activity Fluorometric Assay Kit, 或BACE1 Activity Assay Kit (Fluorometric))是一种用荧光法简单、快速、高通量、高灵敏地检测小鼠、大鼠、人等的组织或细胞样品中β-Secretase 1活性的试剂盒。本试剂盒不仅适合少量样本的检测,也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- β-Secretase 1 (β-分泌酶1),也称为β位淀粉样前体蛋白裂解酶1、β位APP裂解酶1 (Beta-site APP cleaving enzyme 1,简称BACE1)、膜相关天冬氨酸蛋白酶2 (Membrane-associated aspartic protease 2)、Memapsin-2、天冬氨酸蛋白酶2 (Aspartyl protease 2,简称ASP2)。BACE1是一种天冬氨酸蛋白酶,可以切割淀粉样蛋白前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)产生40或42个氨基酸的β-淀粉样蛋白肽(Amyloid-β peptide)。阿尔茨海默氏症(Alzheimer's disease),俗称早老性痴呆、老年痴呆,是一种发病进程缓慢、随着时间不断恶化的神经退化性疾病,会导致脑萎缩和脑细胞死亡。阿尔茨海默氏症患者大脑中β-淀粉样蛋白肽在斑块和血管壁的沉积被普遍认为是导致该疾病的主要因素[1]。实验表明抑制BACE1活性可以有效减少β-淀粉样蛋白肽的产生,因此检测BACE1活性对预测和治疗阿尔茨海默病具有重要意义[2-5]。
- β-Secretase 1 (BACE1)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BACE1蛋白酶的底物(Substrate)的两端。当BACE1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BACE1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BACE1蛋白酶的酶活性。如果在反应体系中加入BACE1的抑制剂(Inhibitor),荧光的生成会被抑制,荧光强度与抑制剂的抑制效果成反比,这样就可以检测出BACE1蛋白酶抑制剂的抑制效果。MCA的最大激发波长为325nm,最大发射波长为393nm。

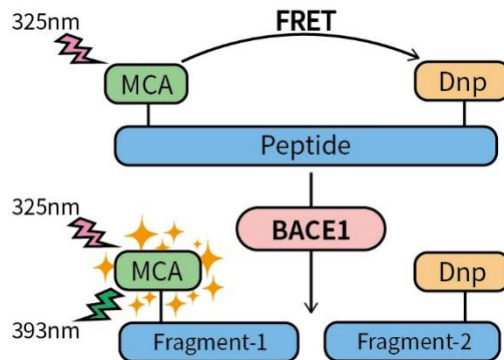


图1. 碧云天β-Secretase 1 (BACE1)活性荧光检测试剂盒(P0362)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高,线性范围宽。本试剂盒提供的底物(BACE1 Substrate)为MCA-EIDLMLVDK(Dnp), BACE1酶剪切该底物的速率比常见的Swedish variant多肽(EVNLDAEF)快约13倍[6],因此该底物更适合用于BACE1抑制剂的筛选。本试剂盒提供的标准品(MCA Standard)在0.25-2.5nmol范围内有良好的线性关系(图2A)。用户可以通过设置标准曲线,计算出样品中BACE1的活性。同时,本试剂盒还提供了BACE1酶阳性对照(Positive Control) (图2B),便于检测体系的建立。

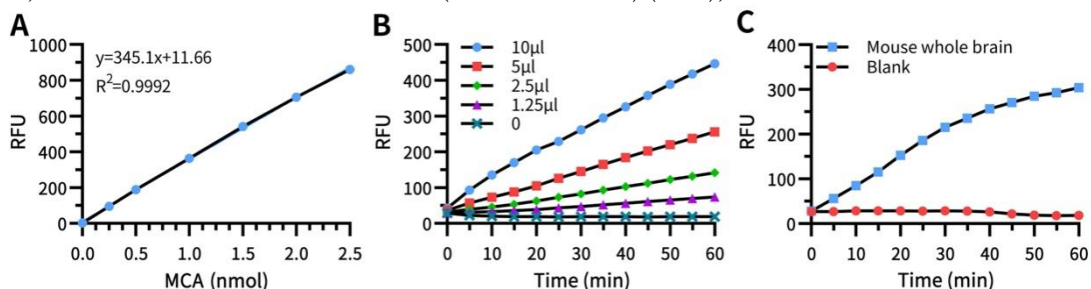


图2. 碧云天β-Secretase 1 (BACE1)活性荧光检测试剂盒(P0362)用于MCA标准曲线、BACE1阳性对照及组织样品的检测效果图。

A. 本试剂盒的MCA标准曲线示意图。B. 不同量的BACE1酶阳性对照(Positive Control)酶切底物, 生成产物的荧光强度示意图。
C. 小鼠脑组织的BACE1酶活性检测效果。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。

- **本试剂盒使用灵活, 检测速度快, 样品用量少。**本试剂盒采用一步法检测, 简单快速, 全程约0.5-1小时即可完成。96孔板中通常1-10 μ l样品足够用于BACE1酶活性的检测。
- 本试剂盒中提供的Lysis Buffer通用性强, 可直接用于裂解细胞或组织样品用于检测BACE1酶活性。
- 用于96孔板检测时, 本试剂盒小包装可以进行100次检测, 中包装可以进行500次检测。

包装清单:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|------------------------------|-------------|
| P0362S-1 | Lysis Buffer | 25ml |
| P0362S-2 | Protein Concentration Buffer | 50ml |
| P0362S-3 | Assay Buffer | 40ml |
| P0362S-4 | BACE1 Substrate (20X) | 500 μ l |
| P0362S-5 | Positive Control | 100 μ l |
| P0362S-6 | MCA Standard (10mM) | 10 μ l |
| — | 说明书 | 1份 |

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|------------------------------|-------------|
| P0362M-1 | Lysis Buffer | 125ml |
| P0362M-2 | Protein Concentration Buffer | 250ml |
| P0362M-3 | Assay Buffer | 200ml |
| P0362M-4 | BACE1 Substrate (20X) | 2.5ml |
| P0362M-5 | Positive Control | 500 μ l |
| P0362M-6 | MCA Standard (10mM) | 50 μ l |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。其中MCA Standard (10mM)和BACE1 Substrate (20X)需避光保存。Positive Control在-80 $^{\circ}$ C保存更佳。

注意事项:

- Protein Concentration Buffer、Assay Buffer、BACE1 Substrate、MCA Standard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在使用时应置于冰上。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。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6.2-6.8之间, 或者确保样品的pH值在6.2-6.8之间, 否则可能会影响检测结果的信号值和稳定性。
- 如果Protein Concentration Buffer中有沉淀, 20-30 $^{\circ}$ C水浴加热可以溶解沉淀; 如果加热后沉淀仍旧存在, 静置或离心后使用上清液。
- 虽然本试剂盒中的BACE1 Substrate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BACE1特异性抑制剂Verubecestat (MK-8931) (SF1183)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)。
- 用于BACE1活性检测时, 细胞、组织等裂解样品如果置于4 $^{\circ}$ C保存, 保存的时间不应超过1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. 细胞或组织样品的制备。

- 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。对于组织样品, 按照每10mg组织加入100 μ l Lysis Buffer的比例进行匀浆。以上所有操作均需在4 $^{\circ}$ C或冰上操作。
- 4 $^{\circ}$ C约12,000 \times g离心3-5分钟。
- 蛋白浓缩(选做):**如果后续检测发现样品的BACE1活性较低, 可进行蛋白浓缩。取500 μ l上清, 加入1ml Protein Concentration Buffer, 轻轻混匀, 4 $^{\circ}$ C静置1小时或者过夜沉淀蛋白。4 $^{\circ}$ C 12,000 \times g离心10分钟, 移除上清液。用50-100 μ l Assay Buffer重新溶解蛋白沉淀。样品的浓缩倍数记为Concentration factor。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测, 可以-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C冻存。如果样品上清比较少, 也可以取100-250 μ l上清, 其它溶液的用量也相应按比例进行调整。

注1: 本步骤不仅可以对细胞或组织样品中的蛋白进行5-10倍浓缩, 而且可以去除干扰后续检测的杂质, 例如小分子、脂质等。

注2: 为获得效果更好的浓缩效果, 建议步骤1c中4°C过夜沉淀蛋白。

2. BACE1 Substrate的准备。

本试剂盒提供的BACE1 Substrate为20X溶液。使用Assay Buffer稀释BACE1 Substrate (20X) 20倍后即可得到BACE1 Substrate (1X), 例如取50μl BACE1 Substrate加入950μl Assay Buffer中, 混匀即得1ml的BACE1 Substrate (1X)。每个反应需要加入100μl BACE1 Substrate (1X)。

注: BACE1 Substrate (1X)需现用现配, 注意避光使用, 不建议反复冻融。

3. 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、15、20、25μl的100μM MCA溶液加入96孔板中, 并用Assay Buffer补足至200μl, 此时, MCA标准曲线的各孔MCA浓度和摩尔数分别为0、1.25、2.5、5、7.5、10、12.5μM和0、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5nmol。也可自行设置适宜的MCA浓度进行标准曲线的设定。

4. 样品测定。

a. 参照下表, 在96孔黑板(FCP966)中设置各组别, 按照下表依次加入检测试剂和样品。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Dilution factor。加入待测样品后, 混匀。为获得更加可靠的检测结果, 建议每个样品至少应该进行2个重复孔的检测。

| Reagent | Blank Control | Positive Control | Sample |
|---------------------|---------------|------------------|--------|
| Assay Buffer | 100μl | 90μl | 90μl |
| Positive Control | - | 10μl | - |
| Sample | - | - | 10μl |
| Total Volume | 100μl | 100μl | 100μl |

b. 除MCA标准曲线外每孔加入100μl BACE1 Substrate (1X), 混匀, 避免产生气泡。

注: 加入BACE1 Substrate后反应会立即开始, 如果孔数较多的情况下, 建议使用排枪操作以减小各孔间加入底物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. 使用多功能酶标仪37°C孵育并进行连续荧光测定。激发波长为325nm、发射波长为393nm, 每5分钟或每10分钟进行一次检测, 连续检测1至2小时。

注: 连续测定的时间可以根据待测样品中BACE1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BACE1酶活较高的样品, 建议测定总时间为30-60分钟, 对应的测定间隔时间设为2分钟或5分钟; 对于BACE1酶活较低的样品, 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分钟或20分钟。

5. 计算。

a. 计算每个空白对照孔、阳性对照孔和样品孔的平均荧光值, 可分别记录为RFU_{Blank Control}、RFU_{Positive Control}和RFU_{Sample}。RFU, Relative Fluorescence Unit。选取待测各组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。可以直接比较各个样品在一定时间内的ΔRFU而确定样品的BACE1相对活性, 但须确保最终时间点时RFU读数未达平台期。

b. 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, 即可计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, 在0.25-2.5nmol (即1.25-12.5μM)范围内有良好的线性关系。BACE1的酶活性的计算公式如下:

$$\text{BACE1 Activity (nmol/min/mg 或 U/mg)} = \frac{A \times \text{Dilution factor}}{\text{Concentration factor} \times V_{\text{sample}} \times T \times C}$$

注: A为步骤5a根据标准曲线确定的MCA的生成量(nmol);

Dilution factor为步骤4a中样品稀释倍数;

Concentration factor为步骤1c中样品浓缩倍数;

V_{sample}为检测时待测样品的体积(V_{sample}=10μl=0.01ml);

T为步骤5a中反应时间间隔(分钟);

C为样品蛋白浓度(mg/ml, 检测步骤参考碧云天BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0011/P0012)或Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型)(P0006C))。

酶活力单位的定义为: 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)。

c. 虽然本试剂盒中的BACE1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BACE1特异性抑制剂Verubecostat (MK-8931) (SF1183)进行验证。

参考文献:

1. Burns A, Iliffe S. BMJ. 2009. 338:b158.
2. Shimizu H, Tosaki A, Kaneko K, Hisano T, Sakurai T, et al. Mol Cell Biol. 2008. 28(11):3663-71.
3. Kennedy ME, Stamford AW, Chen X, Cox K, Cumming JN, et al. Sci Transl Med. 2016. 8(363):363ra150.
4. Liu L, Lauro BM, Ding L, Rovere M, Wolfe MS, et al. Alzheimers Dement. 2019. 15(9):1183-1194.
5. Kulas JA, Franklin WF, Smith NA, Manocha GD, Puig KL, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019. 316(1):E106-E120.

6. Hunt CE, Turner AJ. FEBS J. 2009. 276(7):1845-59.

相关产品:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|-------------------|--|---------------------|
| P0362S | β -Secretase 1 (BACE1)活性荧光检测试剂盒 | 100次 |
| P0362M | β -Secretase 1 (BACE1)活性荧光检测试剂盒 | 500次 |
| P0363S | β -Secretase 1 (BACE1)抑制剂筛选试剂盒 | 100次 |
| P0363M | β -Secretase 1 (BACE1)抑制剂筛选试剂盒 | 500次 |
| P2520-10 μ g | Recombinant Active Human BACE1 (His-Tag) | 10 μ g |
| P2520-100 μ g | Recombinant Active Human BACE1 (His-Tag) | 100 μ g |
| P2520-1mg | Recombinant Active Human BACE1 (His-Tag) | 1mg |
| P9739-0.5ml | MCA-EIDLMLVDK-Dnp (BACE1荧光底物) | 2mM \times 0.5ml |
| P9739-5mg | MCA-EIDLMLVDK-Dnp (BACE1荧光底物) | 5mg |
| P9739-25mg | MCA-EIDLMLVDK-Dnp (BACE1荧光底物) | 25mg |
| SF1183-10mM | Verubecestat (MK-8931) (BACE1/2抑制剂) | 10mM \times 0.2ml |
| SF1183-5mg | Verubecestat (MK-8931) (BACE1/2抑制剂) | 5mg |
| SF1183-25mg | Verubecestat (MK-8931) (BACE1/2抑制剂) | 25mg |
| SF1183-100mg | Verubecestat (MK-8931) (BACE1/2抑制剂) | 100mg |

Version 2023.06.21