

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F054

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长: 325 nm, 发射波长: 395 nm)

Elabscience®血管紧张素转化酶 2 (ACE2)

荧光法测试盒

Angiotensin I Converting Enzyme 2(ACE2) Activity

Fluorescence Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织以及细胞样本中血管紧张素转化酶 2(ACE2)的酶活。

检测原理

血管紧张素转化酶 2(Angiotensin I Converting Enzyme 2, ACE2)是肾素-血管紧张素系统(RAS)的重要组成部分。ACE2 是 RAS 的负调节因子,可平衡 ACE 的多种功能,通过调节血管紧张素 II, ACE2 可以把血管紧张素 II 裂解成 Ang1-7, 其具有保护心脏,舒张血管等活性作用,也是医药科学领域研究的重点活性受体之一。本试剂盒的作用原理是 ACE2 催化底物分解,释放出荧光产物,荧光值越大,样品中 ACE2 酶活越高。通过标准品制作标准曲线,可计算样品中 ACE2 酶活。

本试剂盒检测组织或细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 (Extraction Solution)	40 mL×1 瓶	40 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	0.1 mL×1 支	0.2 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	标准品 (Standard)	0.3 mL×1 支	0.6 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明:试剂严格按上表中的保存条件保存,不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂,使用前请先离心,以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长为 325 nm，发射波长为 395 nm)

试剂：双蒸水

试剂准备

① 检测前，试剂一、试剂二、试剂三和试剂四需平衡至室温待用，否则会影响检测结果。

② 试剂三工作液的配制：

按试剂三：试剂一=1：200体积比配制，混匀，即得到试剂三工作液。例如，取5 μ L试剂三，加入1 mL试剂一，混匀。按需配制，2-8 $^{\circ}$ C避光可保存1天。

③ 100 μ mol/L标准品的配制：

按试剂四：试剂一=1：99体积比配制，混匀，即得到试剂四工作液。例如，取20 μ L试剂四，加入1980 μ L试剂一，混匀。按需配制，2-8 $^{\circ}$ C可保存2天。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μ mol/L)	0	20	40	50	60	70	80	100
100 μ mol/L 标准品(μ L)	0	10	20	25	30	35	40	50
试剂一(μ L)	50	40	30	25	20	15	10	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按组织样本质量(g)：试剂二体积(mL)=1: 9的比例进行匀浆，例如，0.1 g小鼠肺组织，加入0.9 mL试剂二，4℃ 10000 ×g离心10 min后取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞离心后弃上清，用 200 μ L 生理盐水清洗三次。清洗完成后再加入 200 μ L 试剂二匀浆处理，4℃ 10000 ×g 离心 10 min 后取上清，留取一部分上清液进行蛋白浓度测定。

血清血浆样本：直接测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.028-10.47 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肾组织	2-8	1×10^6 293T 细胞	不稀释
10%小鼠肺组织	1-5	1×10^6 HL-60 细胞	1-2
10%小鼠心组织	不稀释	1×10^6 Hela 细胞	1-2
10%小鼠肝组织	不稀释		

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 试剂三和试剂三工作液在使用和配制过程中注意避光。
- ② 根据不同样品中 ACE2 酶的酶活，自行选择合适的稀释倍数，稀释液为试剂一样品。
- ③ 配制不同浓度标准品时可适当离心混匀。
- ④ 加样完成后，可稍微振荡酶标板使反应试剂混合均匀。
- ⑤ 加入底物后反应会立即开始，如果孔数较多的情况下，建议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。

操作步骤

- ① 标准孔：取 10 μL 不同浓度标准品加入到对应的酶标孔中；
测定孔：取 10 μL 样本加入到对应的酶标孔中。
- ② 向标准孔中加入 90 μL 试剂一；
向测定孔中加入 90 μL 试剂三工作液。
- ③ 0 min 时，荧光酶标仪于激发波长 325 nm，发射波长 395 nm 处检测各孔荧光值，记为 F_1
- ④ 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min，荧光酶标仪于激发波长 325 nm，发射波长 395 nm 处检测各孔荧光值，记为 F_2 。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品(μL)	10	--
样本(μL)	--	10
试剂一(μL)	90	--
试剂三工作液(μL)	--	90
0 min 荧光酶标仪于激发波长 325 nm，发射波长 395 nm 处检测各孔荧光值，记为 F_1 ；37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min，荧光酶标仪于激发波长 325 nm，发射波长 395 nm 处检测各孔荧光值，记为 F_2 。		

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织与细胞样本中 ACE2 活力计算公式：

定义：37℃ 条件下，每克样本蛋白每分钟催化底物生成 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{ACE2 活力} \frac{(\text{U/gprot})}{=} (\Delta F_{\text{测}} - b) \div a \div t \div C_{\text{pr}} \times f$$

血清血浆中 ACE2 活力计算公式：

定义：37℃ 条件下，每升血清血浆每分钟催化底物生成 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{ACE2 活力} \frac{(\text{U/L})}{=} (\Delta F_{\text{测}} - b) \div a \div t \times f$$

注解：

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值，标准曲线以标准孔 F₂ 值进行拟合)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF_测: 样本测定孔变化荧光值: F₂ - F₁

t: 反应时间 10 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr}: 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

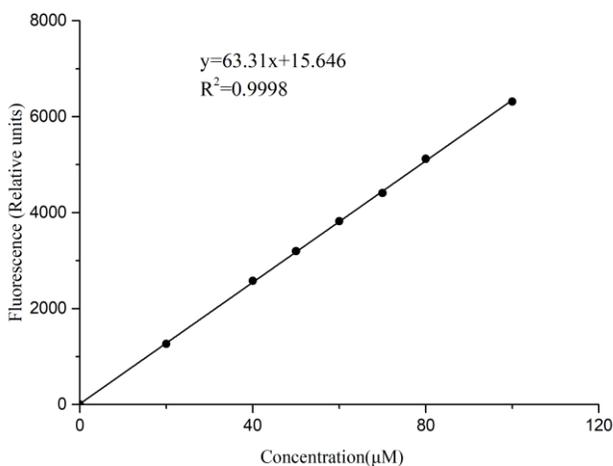
检测范围	0.028-10.47 U/L	批间差	4.4-11.8 %
灵敏度	0.028 U/L	批内差	1.5-3.7 %
稀释回收率	95-102 %		

2. 标准曲线（数据仅供参考）

① 不同浓度标准品加样量10 μL，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/L)	0	20	40	50	60	70	80	100
荧光值	165	1443	2863	3423	3960	4571	5263	6494
	175	1432	2631	3315	4024	4588	5320	6481
平均荧光值	170	1438	2747	3370	3992	4580	5292	6487
绝对荧光值	0	1268	2577	3200	3822	4410	5122	6317

② 绘制标曲(如下图):



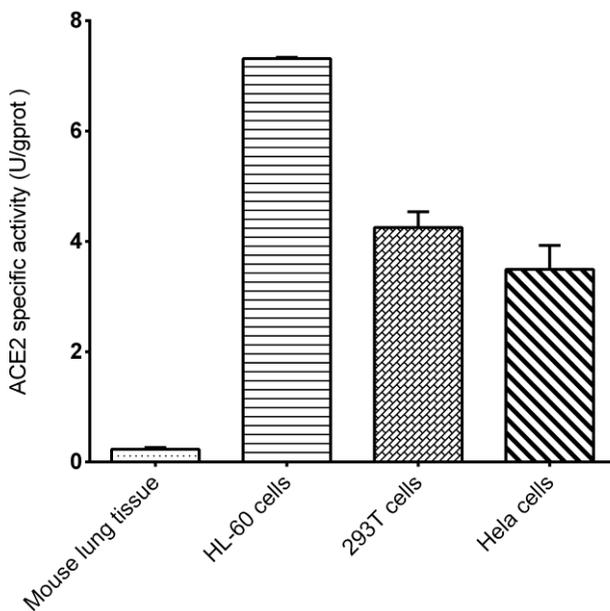
附录2 实例分析

例如检测10%小鼠肺组织(数据仅供参考):

取10%小鼠肺组织匀浆上清液10 μL , 不稀释, 按操作表操作, 结果如下:
标准曲线: $y = 75.669x + 77.011$, 0 min时, 测得测定孔平均荧光值 $F_1 = 329$,
10 min时, 测得测定孔平均荧光值 $F_2 = 1120$, $\Delta F_{\text{测}} = F_2 - F_1 = 1120 - 329 = 791$,
10%小鼠肺组织匀浆蛋白浓度为11.5 gprot/L计算结果为:

$$\text{ACE2活力 (U/gprot)} = (1120 - 329 - 77.011) \div 75.669 \div 10 \div 11.5 \times 1 = 0.09 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定小鼠肺组织(10%组织匀浆蛋白浓度9.47 gprot/L, 稀释2.5倍, 加样量10 μL)、HL-60细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度1.12 gprot/L, 加样量10 μL)、293T细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度0.98 gprot/L, 加样量为10 μL)、Hela细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度1.47 gprot/L, 加样量为10 μL)中的ACE2活性(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本荧光值过高	样本浓度过高	稀释样本至合适浓度, 确保样本荧光值在标准曲线范围内。
复孔差异大	试剂三工作液加样时间较长	同一组实验中, 尽量快速加入底物, 样品多时建议使用移液排枪, 避免时间差导致的随机误差。

声明

1. 试剂盒仅供研究使用, 如将其用于临床诊断或任何其他用途, 我公司将不对因此产生的问题负责, 亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器, 严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责, 使用前请充分考虑样本可能的使用量, 预留充足的样本。

