

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ037

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 GBQ162)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		无要求
	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 μL 试剂三，加入1 mL试剂一，混匀。按需配制，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 避光可保存1天。

③ 100 $\mu\text{mol/L}$ 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 μL 试剂四，加入1980 μL 试剂一，混匀。按需配制，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 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($\mu\text{mol/L}$)	0	20	40	50	60	70	80	100
100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	10	20	25	30	35	40	50
试剂一(μL)	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 μ L 不同浓度标准品加入到对应的酶标孔中；
测定孔：取 10 μ L 样本加入到对应的酶标孔中。
- ② 向标准孔中加入 90 μ L 试剂一；
向测定孔中加入 90 μ L 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°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(μ L)	10	--
样本(μ L)	--	10
试剂一(μ L)	90	--
试剂三工作液(μ L)	--	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°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 GBQ162)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°C 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。

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

血清血浆中 ACE2 活力计算公式：

定义：37°C 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。

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

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 F_2 值进行拟合)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta F_{\text{测}}$: 样本测定孔变化荧光值: $F_2 - F_1$

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

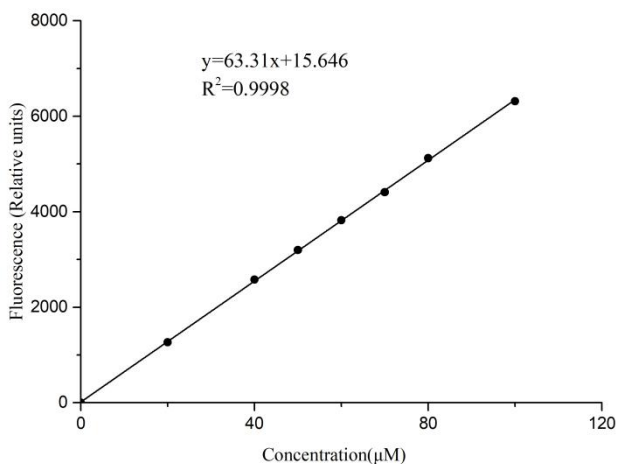
检测范围	0.028-10.47 U/L	批间差	4.4-11.8 %
灵敏度	0.028 U/L	批内差	1.5-3.7 %
稀释回收率	95-102 %		

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 ($\mu\text{mol/L}$)	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)：



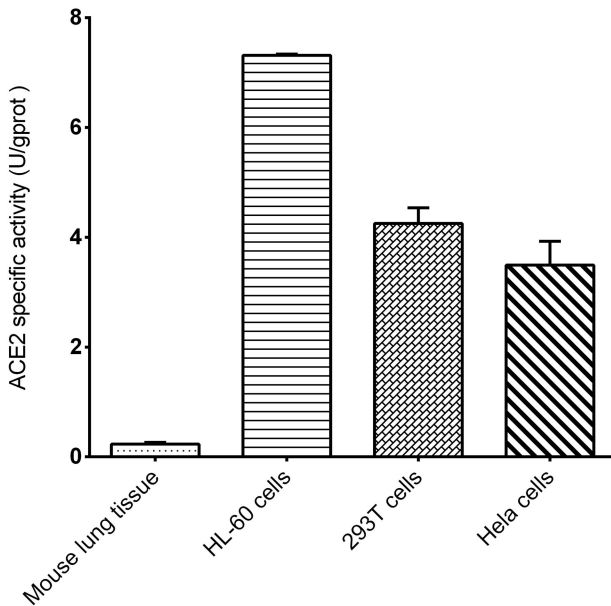
附录2 实例分析

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。

