

血管紧张素转化酶 2(ACE2)活性试剂盒

规格：微量法 48 样

检测原理：荧光法

编号：ml300998

检测波长：325/395nm

注意：

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

血管紧张素转化酶 2(AngiotensinIConverting 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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

天平、离心机、荧光酶标仪、移液器、涡旋混匀仪、黑色 96 孔板、匀浆器。

试剂组成和配制：

试剂名称	规格	数目	贮藏	备注
提取液	液体 60mL	X1	-20℃	

试剂一	液体 10mL	x1	-20℃	
试剂二	液体 100μL	X1	-20℃,避光	
标准品	液体 200μL	X1	-20℃, 避光	10mM MCA

说明：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。

样品处理

细胞：取 5×10^6 个细胞离心后弃上清，用 200μL 生理盐水清洗三次。清洗完成后再加入 1mL 提取液超声破碎处理（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），4℃，10000×g 离心 10min 后取上清，置冰上待测。

组织样本：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，10000×g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清（浆）样品：直接进行检测。

实验准备：

- 1、荧光酶标仪预热 30min 以上，设置温度 37℃，激发波长为 325nm，发射波长为 395nm。
- 2、所有试剂平衡至室温。
- 3、试剂二工作液：按所需用量将试剂二用试剂一稀释 10 倍，4℃ 避光可保存 1 天。

测定操作表：

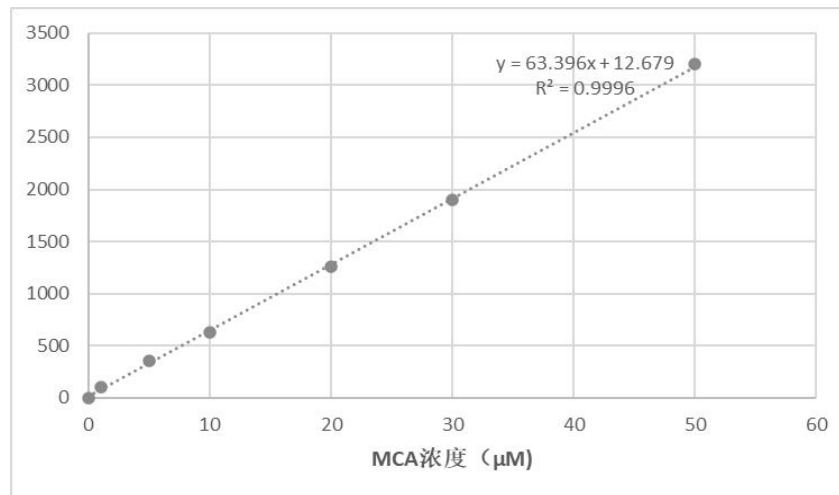
试剂名称	测定管
样本 (μL)	10
试剂一 (μL)	88
试剂二工作液 (μL)	2
混匀，37℃激发波长为 325nm，发射波长为 395nm 下记录 0min 时荧光值记为 A1，记录 10min 时荧光值记为 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

注意：如果 ΔA 大于 2000 可用提取液稀释，如果荧光强度小于 100 可以增加样本量。

结果计算:

标准条件下测定的回归方程为 $y = 63.396x + 12.679$, $R^2 = 0.9996$;

x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$), y 为 ΔA 。



(1) 按照样本质量计算

定义: 37°C 条件下, 每克样本每分钟催化底物生成 $1\mu\text{mol}$ 的产物所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{ACE2 活力(U/g)} = (\Delta A - 12.679) \div 63.396 \times V_{\text{提}} \div W \div T$$

(2) 按照细菌/细胞数量计算

定义: 37°C 条件下, 每 10^4 个细菌/细胞每分钟催化底物生成 $1\mu\text{mol}$ 的产物 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{ACE2 活力(U/10}^4\text{cell)} = (\Delta A - 12.679) \div 63.396 \times V_{\text{提}} \div T \div 500$$

(3) 按照液体体积计算

定义: 37°C 条件下, 每升样本每分钟催化底物生成 $1\mu\text{mol}$ 的产物 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{ACE2 活力(U/L)} = (\Delta A - 12.679) \div 63.396 \div T$$

V 提：提取体积，0.001L

T: 反应时间 10min

W:样本重量，g

500: 细菌/细胞数量，以万计。

附：标准曲线制作过程

1. 把标准品（10mM）用试剂一稀释成以下浓度梯度的标准品：0，1，5，10，20，30，40，50 μ mol/L 也可根据实际样本来调整标准品浓度。
2. 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。x 轴为标准品浓度（ μ mol/L），y 轴为 ΔA 。

	标准管	空白管
标准品（ μ L）	10	-
试剂一（ μ L）	90	100
混匀，37 $^{\circ}$ C激发波长为 325nm，发射波长为 395nm 下记录 10min 后荧光值， $\Delta A=A$ 标准管-A 空白管。		

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。