

血管紧张素转换酶2 (ACE2)抑制剂筛选试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0320S	血管紧张素转换酶2 (ACE2)抑制剂筛选试剂盒	100次
P0320M	血管紧张素转换酶2 (ACE2)抑制剂筛选试剂盒	500次

产品简介:

- 碧云天研发的血管紧张素转换酶2(ACE2)抑制剂筛选试剂盒(ACE2 Inhibitor Screening Kit)是一种用荧光法简单、快速、高通量、高灵敏地筛选血管紧张素转换酶2 (Angiotensin I Converting Enzyme 2 or Angiotensin II Converting Enzyme, 简称ACE2或ACEH)抑制剂的试剂盒。
- 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(metallocarboxypeptidase), 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蛋白的亲合力是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)抑制剂筛选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。如果在反应体系中加入ACE2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ACE2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。

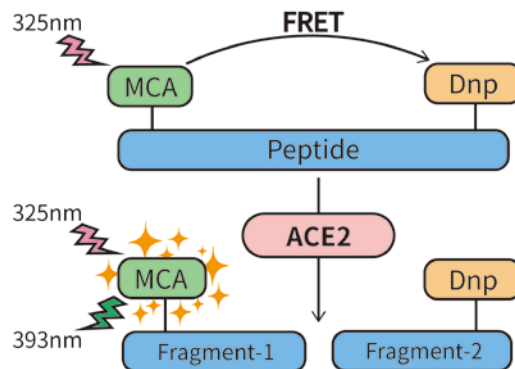


图1. 碧云天血管紧张素转换酶2 (ACE2)抑制剂筛选试剂盒检测原理图。

- **本试剂盒抑制剂筛选结果更加真实可信。**本试剂盒中使用的ACE2 Enzyme是人ACE2蛋白(NP_068576.1)的重组非全长蛋白, 包含ACE2胞外与新冠病毒结合区域和酶活性区域, 不含信号肽, 酶活性好。本试剂盒中使用的底物特异性好, 不会

被蛋白酶Caspase-1、BMP-1/PCP、内肽酶Meprin alpha Subunit/MEP1A等切割。采用本试剂盒用于ACE2抑制剂筛选时，筛选获得的抑制剂更加真实可信。

- **本试剂盒兼容性强。**常用溶剂如DMSO、无水乙醇、甘油等对本试剂盒的检测结果影响较小，实测反应体系中DMSO、无水乙醇或甘油含量达5%时，孵育1小时的信号下降分别不超过20%、8%和10%。去垢剂如Triton X-100等的含量在0.5%时孵育1小时的信号下降不超过25%。检测时通过设置溶剂对照，可以有效消除溶剂对于检测体系的影响。
- **本试剂盒信号佳。**本试剂盒在孵育1小时时，100%酶活性信号约为背景信号的50-100倍，确保有足够的信号范围用于抑制剂的筛选。通常在孵育1小时内，信号与孵育时间成正比，1小时后即趋于稳定。
- 本试剂盒中提供了ACE2酶(ACE2 Enzyme)、底物(Substrate)、阳性对照抑制剂(MLN-4760)，并且对ACE2酶和底物的使用量进行了优化，不仅能检测出IC₅₀很低的抑制剂，也能检测出IC₅₀较高的抑制剂。本试剂盒提供的阳性对照MLN-4760(SF1197)是一种有效、选择性的人ACE2抑制剂，在本试剂盒中的IC₅₀约为7nM，实测数据会略有偏差。
- 使用96孔板检测时，本试剂盒小包装P0320S可以进行100次检测，中包装P0320M可以进行500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0320S-1	Assay Buffer	30ml
P0320S-2	ACE2 Enzyme	100μl
P0320S-3	Substrate	200μl
P0320S-4	MLN-4760 (0.5mM)	10μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0320M-1	Assay Buffer	125ml
P0320M-2	ACE2 Enzyme	500μl
P0320M-3	Substrate	1ml
P0320M-4	MLN-4760 (0.5mM)	25μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中P0320-3 Substrate需避光保存。

注意事项：

- Assay Buffer、Substrate、MLN-4760 (0.5mM)需完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。ACE2 Enzyme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。
- 请确保加入样品后反应体系的pH值在6.5-7之间，或确保样品的pH值在6.5-7之间，否则可能会影响检测结果的信号值和稳定性。
- 待测抑制剂样品的溶剂可能会对检测产生干扰，推荐使用本试剂盒提供的Assay Buffer作为溶剂用于配制、稀释样品。如果样品必须用其它试剂配制、稀释，请进行一定的测试，并添加与样品等量的溶剂作为100%酶活性对照。
- 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。
- 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)。
- 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。

取适量待测定的抑制剂样品，用Assay Buffer或DMSO等适当的溶剂配制或成适宜浓度的溶液，如果有必要可配制或成适当的浓度梯度待用。

2. 阳性对照的准备。

本试剂盒提供的阳性对照抑制剂MLN-4760浓度为0.5mM，配制在DMSO中，可以根据需要使用与待测抑制剂一样的溶剂稀释成所需浓度或浓度梯度。通常MLN-4760的IC₅₀约为5-40nM，使用本试剂盒时MLN-4760的抑制效果参考图2。

3. 样品测定。

- a. 根据样品数量(含相关对照)，参考下表配制适量的Assay Reagent。**注：**由于ACE2 Enzyme的甘油含量较高，微量吸取时要注意避免吸头吸附损失并吹打完全，加入ACE2 Enzyme后需要注意充分混匀。

	1个样品	5个样品	10个样品	20个样品
Assay Buffer	92μl	460μl	920μl	1.84ml
ACE2 Enzyme	1μl	5μl	10μl	20μl

- b. 参考下表，使用96孔黑板设置各组别，并按照下表依次加入检测试剂和样品。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。

	空白对照	100%酶活性对照	阳性抑制剂对照	样品

Assay Buffer	93μl	-	-	-
Assay Reagent	-	93μl	93μl	93μl
MLN-4760溶液	-	-	5μl	-
样品溶剂	5μl	5μl	-	-
待测样品	-	-	-	5μl

注：样品溶剂是指配制和稀释待测抑制剂所用的溶剂。如果特定的溶剂对于检测体系的干扰比较大，可以减少溶剂和待测样品的用量至 1-3μl，同时相应地增加 Assay Buffer 的用量。

- c. 各孔快速加入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。
- d. 37°C避光孵育30-60分钟后使用多功能酶标进行荧光测定。激发波长为325nm，发射波长为393nm。当荧光读数偏低时，也可适当延长孵育时间至2小时。

注：也可在步骤b中将待测样品加入后37°C孵育10-30分钟，再将Substrate加入反应体系中。37°C孵育10-30分钟再加入Substrate可能会降低抑制剂的IC₅₀。建议通过预实验确定未知抑制剂比较适合的孵育时间。

4. 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_{100%酶活性对照}、RFU_{阳性对照}和RFU_{样品}。RFU，Relative Fluorescence Unit。
- b. 计算每个样品的抑制百分率。计算公式如下：
抑制率(%) = (RFU_{100%酶活性对照} - RFU_{样品}) / (RFU_{100%酶活性对照} - RFU_{空白对照}) × 100%
- c. 对于检测发现有效的抑制剂，通过检测该抑制剂的剂量效应就可以计算出该抑制剂的IC₅₀。使用本试剂盒检测MLN-4760 (SF1197)和DX600 (SF1201)对于ACE2的抑制作用的检测结果参考图2，Substrate直接加入反应体系中，然后孵育60分钟进行荧光测定，MLN-4760的IC₅₀约为7.5nM，DX600的IC₅₀约为0.15μM。

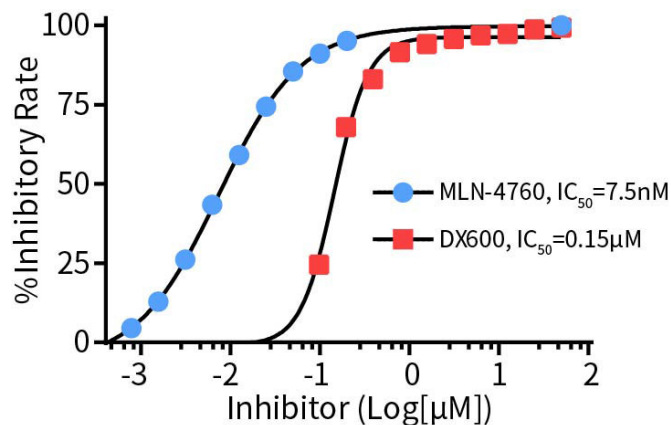


图2. 血管紧张素转换酶2 (ACE2)抑制剂筛选试剂盒检测ACE2抑制剂MLN-4760和DX600的效果图。实际检测结果可能会因样品和检测条件等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

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
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
P0320S	血管紧张素转换酶2 (ACE2)抑制剂筛选试剂盒	100次
P0320M	血管紧张素转换酶2 (ACE2)抑制剂筛选试剂盒	500次
P2320-200μg	2019-nCoV Main Protease (新型冠状病毒主蛋白酶)	200μg
P2320-1mg	2019-nCoV Main Protease (新型冠状病毒主蛋白酶)	1mg
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
P9735-0.1ml	MCA-YVADAPK(Dnp)-OH (ACE2荧光底物)	20mM×0.1ml
P9735-5mg	MCA-YVADAPK(Dnp)-OH (ACE2荧光底物)	5mg
P9735-25mg	MCA-YVADAPK(Dnp)-OH (ACE2荧光底物)	25mg
P9737-0.1ml	MCA-APK(Dnp)-OH (ACE2荧光底物)	20mM×0.1ml
P9737-5mg	MCA-APK(Dnp)-OH (ACE2荧光底物)	5mg
P9737-25mg	MCA-APK(Dnp)-OH (ACE2荧光底物)	25mg
R0011	Beyozol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0016	Trizol (总RNA抽提试剂)	100ml
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(病毒RNA等抽提用)	200μg
R0036-1mg	Carrier RNA(病毒RNA等抽提用)	1mg
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0141-100ml	RNA Later™病毒RNA稳定保存液	100ml
R0141-500ml	RNA Later™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
SF1201-5mg	DX600 (ACE2抑制剂)	5mg
SF1201-25mg	DX600 (ACE2抑制剂)	25mg
SF1201-100mg	DX600 (ACE2抑制剂)	100mg
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 2020.12.07