

血管紧张素转化酶2活性试剂盒

规格：微量法 48样

检测原理：荧光法

编号：JLC_K14873

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60mL	x1	-20℃	
试剂二	液体60mL	x1	-20℃,避光	
标准品	液体60mL	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200 μ L 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 $^{\circ}$ C，10000 $\times$ 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 $\times$ g，4 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C，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 $^{\circ}$ C避光可保存1天。

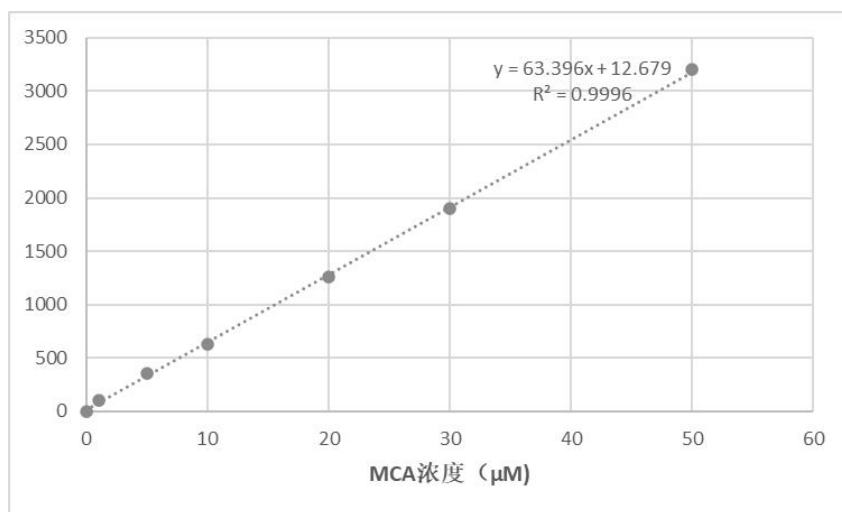
测定操作表：

试剂名称	测定管
样本（ μ L）	10
试剂一（ μ L）	88
试剂二工作液（ μ L）	2
混匀，37 $^{\circ}$ C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 $y = 63.396 + 12.679x$ ， $R^2 = 0.9996$ ；x为标准品浓度（ μ mol/L），y为 ΔA 。



(1) 按照样本质量计算

定义：37℃条件下，每克样本每分钟催化底物生成1μmol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℃条件下，每10⁴个细菌/细胞每分钟催化底物生成1μmol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℃条件下，每升样本每分钟催化底物生成1μmol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 $\mu\text{mol/L}$ 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（ $\mu\text{mol/L}$ ），y轴为 ΔA 。

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

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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。