

ACE Kit-WST

血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂活性检测试剂盒

概述

血管紧张素转换酶(ACE)可以通过血压调节机制之一的肾素-血管紧张素系统, 将血管紧张素 I (Angiotensin I) 转化成具有升压作用的血管紧张素 II(Angiotensin II)。同时, 它还可以分解降压肽之一的缓激肽(Bradyinin), 是一种与血压上升有很大关系的酶。近年来, 市面上有许多以预防高血压为目的的功能性食品(特定保健用途食品), 而其中具有 ACE 抑制活性的食品备受关注。传统的 ACE 抑制活性检测法是通过测定马尿酸在 228nm 处的吸光度来计算的, 马尿酸是从合成底物 Hippuryl-His-Leu 中生成, 经过乙酸乙酯溶剂提取、浓缩干燥、再溶解得到的。该方法需要使用乙酸乙酯等有害的有机溶剂, 且操作复杂, 容易产生测量误差, 因此急需一种操作更简单、结果更准确的检测方法。同仁化学研究所开发的 ACE Kit-WST 是一种新型酶法检测试剂盒。通过检测 3-Hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly(3HB-GGG)中得到的 3-Hydroxybutyric acid(3HB), 可以更安全、快速、简单的检测 ACE 抑制活性。本方法还可以使用 96 孔板进行多样品检测, 进一步提高了检测的快捷性和重现性。

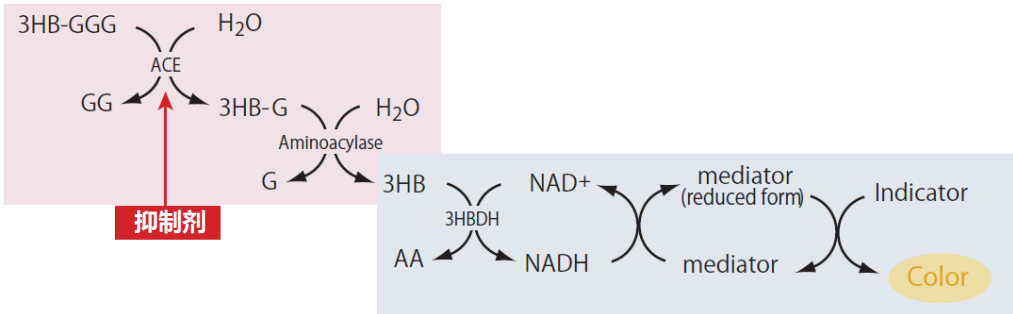


图 1. ACE Kit-WST 的检测原理

产品信息

	50 tests	100 tests
Substrate buffer	1 mL × 1	1 mL × 2
Enzyme A	× 1	× 2
Enzyme B	× 1	× 2
Enzyme C	× 1	× 2
Coenzyme	× 1	× 2
Indicator solution	5 mL × 1	5 mL × 2

保存条件

0~5℃保存。本试剂盒在未开封状态可稳定保存 6 个月。

- 酶标仪(450 nm Filter)
- 2-20 μL、20-200 μL、100-1000 μL 移液器
- 多通道移液器
- 96 孔板
- 培养箱(37℃)
- 一次性注射器

所需设备和材料

注意事项

- 本试剂盒含有玻璃容器, 操作时建议佩戴手套并小心操作。
- 为了得到更准确的实验结果, 建议每个样品设置复孔 (n=3)。
- 如果待测样品是非水溶性的, 先使用 DMSO 或乙醇溶解制成 Stock solution, 然后再用 Buffer 进行稀释, 并控制 DMSO 或乙醇的含量在 1%以下。
- 如果待测样品含有柠檬酸、醋酸等, 会导致 Substrate buffer 的底物发生沉淀, 无法显色。请中和至 pH5 以上。
- 如果待测样品含有维生素 C, 会还原 Indicator solution 导致假阳性。请控制维生素 C 含量在 0.01%以下。
- 如果待测样品含有不溶性固体物质, 请将其离心过滤。固体物质会影响吸光度的测定。

溶液配制

Enzyme working solution 的制备

每管 Enzyme B 中加入 2 mL 纯水制成 Enzyme B 溶液。每管 Enzyme A 中, 加入 1.5 mL Enzyme B 溶液制成 Enzyme working solution。

*Enzyme A 和 B 管在开封前都是减压状态, 如果直接打开瓶盖容易造成试剂飞溅。请务必使用注射器先将水或 Enzyme B 溶液加至管中, 充分溶解后再开封。

*请务必按照, 先用水溶解 Enzyme B, 再用 1.5 mL 溶解 Enzyme A 的顺序操作。顺序颠倒会造成显色降低。

*Enzyme working solution 冷冻(-20℃)可稳定保存 2 周, 冷藏(0-5℃)可稳定保存 3 天。

Indicator working solution 的制备

每管 Enzyme C 和 Coenzyme 中加入 3 mL 纯水, 分别制成 Enzyme C 和 Coenzyme 溶液。

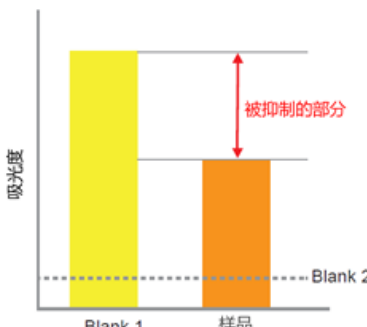
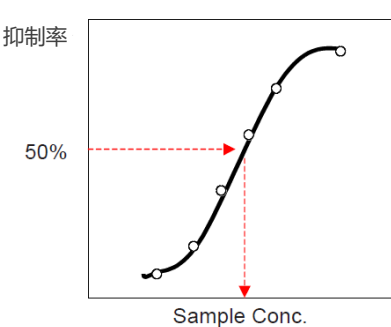
每管 Indicator solution 中分别加入 2.8 mL Enzyme C 和 Coenzyme 溶液, 制成 Indicator working solution。

* Enzyme C 和 Coenzyme 管在开封前都是减压状态, 如果直接打开瓶盖容易造成试剂飞溅。

请务必使用注射器先将纯水加至管中, 充分溶解后再开封。

*Indicator working solution 冷冻(-20℃)可稳定保存 2 周, 冷藏(0-5℃)可稳定保存 3 天。

两种实验操作步骤，根据实验目的选择其中一种进行实验。

Protocol 1 确定 ACE 抑制剂活性的有无	Protocol 2 检测 IC ₅₀
 n=3 时，可检测 14 个样品(50 tests)，28 个样品(100 tests) 详细的操作步骤请参照本说明书第二页。	 n=3 时，可检测 2 个样品(50 tests)，4 个样品(100 tests) 详细的操作步骤请参照本说明书第三页。

Protocol 1

样品溶液的配制

操作步骤

确定 ACE 抑制剂活性的有无

每个样品至少需要 100 μL 样品溶液。*不足 100 μL 时，请用纯水进行稀释。

参考表 1 和图 2：

1. 每孔分别加入 20 μL 样品溶液(Sample 孔)或纯水(Blank 1,Blank 2 孔)。
2. 每孔分别加入 20 μL Substrate buffer。
3. Blank 2 的各孔中加入 20 μL 纯水。
4. Sample 孔和 Blank 1 孔中分别加入 20 μL Enzyme working solution。
*Enzyme working solution 加入后会立即产生 3-Hydroxybutyric acid(3HB)，为了减少孔间差，建议使用排枪。
5. 培养箱内 37°C 培养 60 min。
6. 每孔加入 200 μL Indicator working solution。
7. 室温下培养 10 min。
8. 酶标仪检测 450 nm 处吸光度。

表 1. 各孔添加溶液的体积

	Sample 孔	Blank 1 孔	Blank 2 孔
样品溶液	20 μL	-	-
纯水	-	20 μL	40 μL
Substrate buffer	20 μL	20 μL	20 μL
Enzyme working solution	20 μL	20 μL	-
Indicator working solution	200 μL	200 μL	200 μL

Blank 1：无抑制的全显色

Blank 2：试剂的空白对照

*如果样品本身含有颜色，用相同稀释倍率的样品溶液做 Sample Blank (20 μL 样品 + 240 μL 纯水)，最终检测结果需要扣除 Sample Blank。尤其是黄色~红色，对 450 nm 处吸光度的影响最大。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1			Sample 8								
B	Sample 2			Sample 9								
C	Sample 3			Sample 10								
D	Sample 4			Sample 11								
E	Sample 5			Sample 12								
F	Sample 6			Sample 13								
G	Sample 7			Sample 14								
H	blank 1			blank 2								

图 2. 孔板设置例(n=3 时)

<ACE 抑制剂活性的评价>

ACE 抑制剂活性值(抑制率%)按照下列公式计算。

ACE 抑制剂活性值(抑制率%)=

$$\frac{[(A_{Blank\ 1} - A_{Sample}) / (A_{Blank\ 1} - A_{Blank\ 2})] \times 100}$$

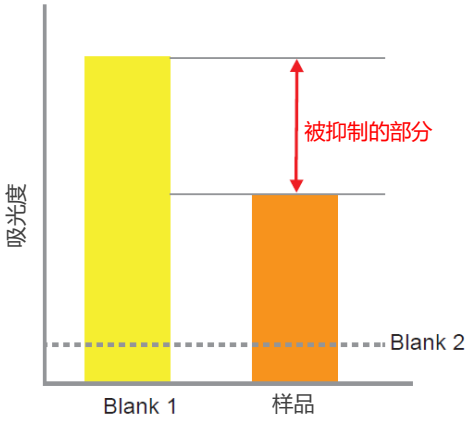


图 3. ACE 抑制剂活性的评价

用纯水稀释样品溶液

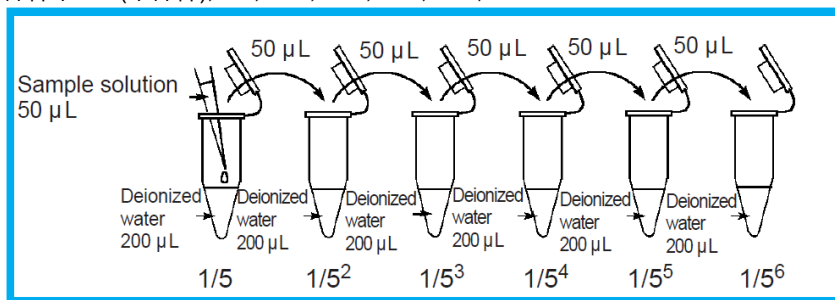
例) 稀释率: 1 (未稀释), 1/5, 1/5², 1/5³, 1/5⁴, 1/5⁵, 1/5⁶

图 4. Sample solution 配制例

操作步骤

参考表 2 和图 5:

1. 每孔分别加入 20 µL 样品溶液(Sample 孔)或纯水(Blank 1, Blank 2 孔)。
 2. 每孔分别加入 20 µL Substrate buffer。
 3. Blank 2 的各孔中加入 20 µL 纯水。
 4. Sample 孔和 Blank 1 孔中分别加入 20 µL Enzyme working solution。
- *Enzyme working solution 加入后会立即产生 3-Hydroxybutyric acid(3HB), 为了减少孔间差, 建议使用排枪。
5. 培养箱内 37°C 培养 60 min。
 6. 每孔加入 200 µL Indicator working solution。
 7. 室温下培养 10 min。
 8. 酶标仪检测 450 nm 处吸光度。按照下列公式进行计算 ACE 抑制剂活性值(抑制率%)。

$$\text{ACE 抑制剂活性值(抑制率\%)} = [(A_{\text{Blank 1}} - A_{\text{Sample}}) / (A_{\text{Blank 1}} - A_{\text{Blank 2}})] \times 100$$

表 2. 各孔添加溶液的体积

	Sample 孔	Blank 1 孔	Blank 2 孔
样品溶液	20 µL	-	-
纯水	-	20 µL	40 µL
Substrate buffer	20 µL	20 µL	20 µL
Enzyme working solution	20 µL	20 µL	-
Indicator working solution	200 µL	200 µL	200 µL

Blank 1: 无抑制的全显色

Blank 2: 试剂的空白对照

*如果样品本身含有颜色, 用相同稀释倍率的样品溶液做 Sample Blank (20 µL 样品 + 240 µL 纯水), 最终检测结果需要扣除 Sample Blank。尤其是黄色~红色, 对 450 nm 处吸光度的影响最大。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1			Sample 2								
B	Sample 1/5			Sample 2/5								
C	Sample 1/5 ²			Sample 2/5 ²								
D	Sample 1/5 ³			Sample 2/5 ³								
E	Sample 1/5 ⁴			Sample 2/5 ⁴								
F	Sample 1/5 ⁵			Sample 2/5 ⁵								
G	Sample 1/5 ⁶			Sample 2/5 ⁶								
H	blank 1			blank 2								

图 5. 孔板设置例(n=3 时)

<IC₅₀ 的计算方法>

- 分别以样品浓度和抑制剂活性为轴横纵坐标制作抑制曲线。
- 由抑制曲线得到抑制率 50% 时样品的浓度。
- 由于反应时样品的终浓度是样品溶液浓度的 1/3, 所以由抑制曲线得到的浓度的 1/3 即 IC₅₀。

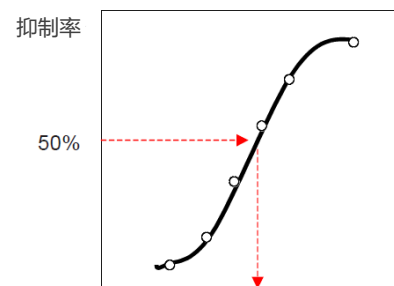


图 6. 抑制曲线

参考文献

1. Le Hoang Lam, T. Shimamura, K. Sakaguchi, K. Noguchi, M. Ishiyama, Y. Fujimura and H. Ukeda, *Anal. Biochem.*, **2007**, 364,104.
2. Le Hoang Lam, T. Shimamura, S. Manabe, M. Ishiyama and H. Ukeda, *Anal. Sci.*, **2008**, 24, 1057.

本产品仅供实验室研究使用, 不可用于临床诊断。如果您需要更多信息请通过下面的联系方式联系我们:

网址: www.dojindo.cn

东仁化学科技(上海)有限公司

上海市零陵路 899 号飞洲国际广场 27 楼 J 座

邮编: 200030

电话: 400-823-9388

E-mail: info@dojindo.cn

北仁化学科技(北京)有限公司

北京市朝阳区裕民路 12 号元辰鑫大厦 E1-210 室

邮编: 100029

电话: 010-8225-1765