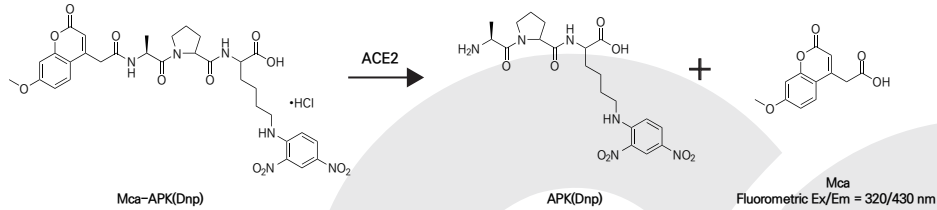


## PicoSens™ ACE 2 Activity Assay Kit (Fluorometric)

(BM-ATA-F100, 100 assays, Store at -20°C)

### 제품 원리



BIOMAX PicoSens™ ACE 2 Inhibitor Screening Assay Kit (Fluorometric)에서 ACE 2에 의해 Mca-APK(Dnp)이 절단되어 APK(Dnp)와 Mca를 방출됩니다. 방출된 Mca가 Fluorometric Ex/Em = 320/420nm 에서 측정되며 이를 통해 ACE 2의 활성을 알 수 있습니다.

### 제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
ACE 2 Assay Buffer	25 ml	-20°C
ACE 2 Lysis Buffer	25 ml x 2 Bottles	
ACE 2 Dilution Buffer	1.5 ml	
ACE 2 Positive Control	5 µl	
ACE 2 Substrate	200 µl	
ACE 2 Inhibitor	50 µl	
MCA-Standard (1 mM)	15 µl	

\* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20°C 보관 시 약 6개월간 안정적입니다.

### 검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (White, Flat bottom)
- ▶ 8 or 12 Channel micropipette
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ Micro centrifuge (4°C)
- ▶ Fluorescence microplate reader (Ex/Em = 320/420 nm Filter)
- ▶ BCA Protein Assay Kit (BIOMAX Cat. BCA0500)

### 실험 전 준비사항 및 보관 방법

- ▶ 제품의 모든 구성품은 상온에서 놔두어 완전히 녹인 후 사용합니다.
- ▶ Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다
- ▶ **ACE 2 Substrate** : 사용 후 -20°C에 보관합니다. (해동, 냉동을 반복하지 마십시오.)
- ▶ **ACE 2 Positive Control** : ACE 2 Dilution Buffer 190 µl를 넣고 소량 Aliquot하여 사용합니다. -20°C에 보관하며 희석 후 3개월까지 안정적입니다.
- ▶ **MCA-Standard** : 사용 후 -20°C에 보관합니다.

### Sample type

- Animal tissue ( Lung, Heart, Kidney )
- Overexpressed ACE 2 in cell lysates

### Sample preparation

#### Tissue / Cell

- ① Tissue (~100 mg) 또는 Pelleted cells (1~2 x 10<sup>6</sup> cells)에 ACE 2 Lysis Buffer 400 µl를 넣고 Homogenize 한 후 10 min 간 Ice에 넣어줍니다.
- ② 10 sec 동안 Vortexing 후 5 min 간 Ice에 넣어줍니다.
- ③ 4°C에서 16,000 x g로 10 min 간 Centrifuge를 합니다.
- ④ Supernatant를 새로운 Microtube로 옮긴 후 Ice에 넣어두고 실험에 사용합니다.
  - 측정 Sample의 Several dilution을 준비하여 실험을 진행합니다.
  - 실험하기 전 Sample을 BCA Assay Kit 사용하여 농도를 측정합니다.
  - 실험 후 보관 시 -80°C에서 보관합니다.

## 실험 과정

- \* 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample 의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험 진행하신 후 사용을 권장합니다.
- \* Standard는 실험할 때마다 Standard solution으로 희석하여 사용하며 희석한 Standard solution은 재사용하지 마십시오.
- \* Standard solution은 결과 분석할 때마다 사용되므로 실험 진행시 매번 준비합니다.

## Standard preparation

1 mM MCA-Standard 5  $\mu\text{l}$ 와 ACE 2 Assay Buffer 195  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 25  $\mu\text{M}$  MCA-Standard를 만들어 아래 표와 같이 Standard solution을 만듭니다.

MCA-Standard	Vol. of STD ( $\mu\text{l}$ ) (25 $\mu\text{M}$ )	ACE 2 Assay Buffer ( $\mu\text{l}$ )	Final STD Vol. in well ( $\mu\text{l}/\text{well}$ )	Final STD Amount in well (pmol/well)
1	10	90	100	250
2	8	92	100	200
3	6	94	100	150
4	4	96	100	100
5	2	98	100	50
6	0 [Blank]	100	100	0

\* Single test 기준입니다. Duplicate 또는 Triplicate를 권장합니다.

- 준비된 Standard solution을 96-well Microplate에 분주 후 End point mode로 형광을 측정합니다.  
(Ex/Em=320/420 nm)
- 준비된 Sample을 Sample well [S]에 2  $\mu\text{l}$  씩 분주합니다. 희석이 필요할 경우 ACE 2 Lysis Buffer로 희석하여 사용합니다.
- Background Control [BC] well에 ACE 2 Lysis Buffer 2  $\mu\text{l}$ 를 분주합니다.
- Positive Control [PC] well과 Negative Control [NC] well에 각각 ACE 2 Positive Control 2  $\mu\text{l}$  를 분주합니다.
- Negative Control [NC] well에 ACE 2 Inhibitor 2  $\mu\text{l}$ 를 분주합니다.
- [S], [BC], [PC] well에 각각 ACE 2 Assay Buffer 48  $\mu\text{l}$ 를 분주합니다.
- [NC] well에 ACE 2 Assay Buffer 46  $\mu\text{l}$ 를 분주합니다.
- 아래와 같이 ACE 2 Substrate mix를 만들어 [S], [BC], [PC], [NC] well에 각각 50  $\mu\text{l}$  를 분주 후 Kinetic mode로 30 min ~ 2 h 동안 형광을 측정합니다. (Ex/Em=320/420 nm)

## ACE 2 Substrate mix

1 reaction/50  $\mu\text{l}$  기준으로 총 소요량보다 약 10 % 많은 Reaction mix 준비합니다.(사용 전 Spin-down)

Kit Components	ACE 2 Substrate mix (50 $\mu\text{l}/\text{well}$ )
ACE 2 Substrate	2 $\mu\text{l}$
ACE 2 Assay Buffer	48 $\mu\text{l}$

\* 희석한 용액은 -20°C에서 3개월간 안정적입니다.

## 결과 분석

$$\text{Sample ACE 2 Activity} = \frac{(B \times D)}{(\Delta T \times P)} = \text{pmol}/\text{min}/\text{mg} = \text{mU}/\text{mg}$$

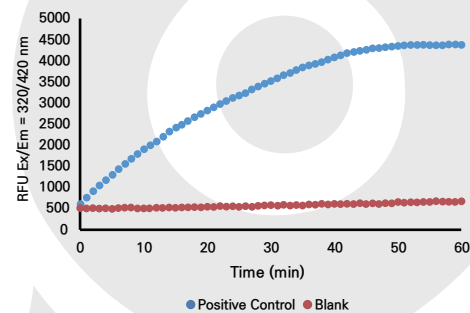
모든 Reading 값에서 0 값을 빼줍니다.

**B** : ACE 2 Standard curve의 Sample MCA

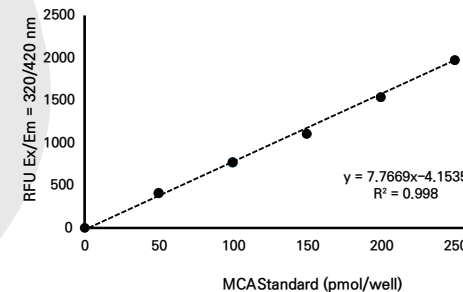
$\Delta T$  : Reaction time (min)

**P** : Reaction well의 Sample 양 (mg)

**D** : Sample 희석 배율



Kinetic activity curve using ACE 2 Positive Control



MCA-Standard Curve (0-250 pmol)

## Related products

BM-AOA-F100	Angiotensin I Converting Enzyme (ACE1) Activity Assay Kit
BM-AOS-F100	Angiotensin I Converting Enzyme (ACE1) Inhibitor Screening Kit
BM-ATS-F100	AngiotensinII Converting Enzyme (ACE2) Inhibitor Screening Kit

\* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.