

β-Secretase 1 (BACE1)抑制剂筛选试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0363S	β-Secretase 1 (BACE1)抑制剂筛选试剂盒	100次
P0363M	β-Secretase 1 (BACE1)抑制剂筛选试剂盒	500次

产品简介:

- 碧云天研发的β-Secretase 1 (BACE1)抑制剂筛选试剂盒(BACE1 Inhibitor Screening Kit)是一种用荧光法简单、快速、高通量、高灵敏地筛选β-Secretase 1抑制剂的试剂盒。本试剂盒不仅适合少量样本的检测,也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- β-Secretase 1 (β-分泌酶1),也称为β位淀粉样前体蛋白裂解酶1、β位APP裂解酶1 (Beta-site APP cleaving enzyme 1,简称BACE1)、膜相关天冬氨酸蛋白酶2 (Membrane-associated aspartic protease 2)、Memapsin-2、天冬氨酸蛋白酶2 (Aspartyl protease 2,简称ASP2)。BACE1是一种天冬氨酸蛋白酶,在多种人体组织中表达,可以切割淀粉样蛋白前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)产生40或42个氨基酸的β-淀粉样蛋白肽(Amyloid-β peptide)。阿尔茨海默氏症(Alzheimer's disease),俗称早老性痴呆、老年痴呆,是一种发病进程缓慢、随着时间不断恶化的神经退行性疾病,会导致脑萎缩和脑细胞死亡。阿尔茨海默氏症患者大脑中β-淀粉样蛋白肽在斑块和血管壁的沉积被普遍认为是导致该疾病的主要因素[1]。实验表明抑制BACE1活性可以有效减少β-淀粉样蛋白肽的产生,因此筛选BACE1抑制剂作为治疗阿尔茨海默病的药物成为热门治疗靶标[2-5]。
- β-Secretase 1 (BACE1)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BACE1蛋白酶的底物(Substrate)的两端。当BACE1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BACE1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BACE1蛋白酶的酶活性。如果在反应体系中加入BACE1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BACE1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。

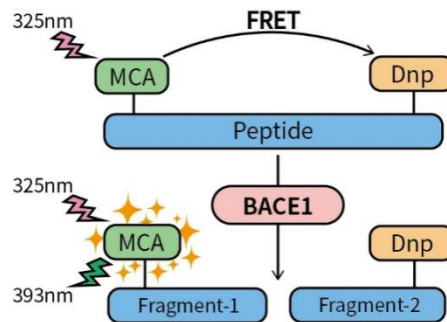


图1. 碧云天β-Secretase 1 (BACE1)抑制剂筛选试剂盒(P0363)检测原理图。

- **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BACE1 Enzyme是采用HEK293真核细胞表达human BACE1 (Swiss-Prot:P56817)胞外的酶活性区域(Glu46-Thr457),含有天然BACE1全部4个N-glycosylation糖基化修饰(Asn153, Asn172, Asn223和Asn354),与天然BACE1相比在结构和功能方面相同,因此采用本试剂盒筛选获得的BACE1抑制剂更加真实有效。
- **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倍,确保有足够的信号范围用于抑制剂的筛选。通常在孵育2小时内,信号与孵育时间成正比,2小时后即趋于稳定。
- 本试剂盒提供了BACE1酶(BACE1 Enzyme)、底物(BACE1 Substrate)、阳性对照抑制剂(Verubecestat (MK-8931))。底物为MCA-EIDLMLVDK(Dnp),BACE1酶剪切该底物的速率比常见的Swedish variant多肽(EVNLDAEF)快约13倍[6],因此该底物更适合用于BACE1的抑制剂筛选。本试剂盒对BACE1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Verubecestat (MK-8931)是一种高效、选择性的BACE1/2抑制剂,经本试剂盒检测的IC₅₀约为32nM,实测数据会略有偏差。本试剂盒检测Verubecestat (MK-8931)的效果请参考图2。

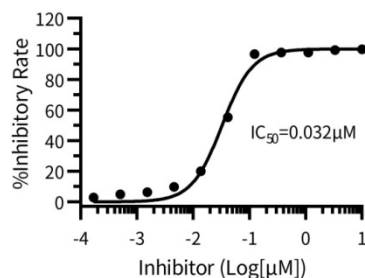


图2. 碧云天β-Secretase 1 (BACE1)抑制剂筛选试剂盒(P0363)检测BACE1抑制剂MK-8931的效果图。实际检测结果可能会因样品和检测条件等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

➤ 使用96孔板检测时，本试剂盒小包装可以进行100次检测，中包装可以进行500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0363S-1	Assay Buffer	20ml
P0363S-2	BACE1 Substrate (20X)	500μl
P0363S-3	BACE1 Enzyme	1ml
P0363S-4	Verubecestat (MK-8931) (1mM)	10μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0363M-1	Assay Buffer	100ml
P0363M-2	BACE1 Substrate (20X)	2.5ml
P0363M-3	BACE1 Enzyme	5ml
P0363M-4	Verubecestat (MK-8931) (1mM)	50μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中BACE1 Substrate (20X)需避光保存。为取得更理想的检测效果，BACE1 Enzyme推荐在-80°C保存。

注意事项：

- 由于BACE1 Enzyme每次冻融均会引起部分失活，建议分装后放入-80°C保存，尽量避免反复冻融。
- Assay Buffer、BACE1 Substrate、MK-8931需完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。BACE1 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。
- 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. 样品的制备。

取适量待测定的抑制剂样品，用Assay Buffer或DMSO等适当的溶剂配制成适宜浓度的溶液，如果有必要可配制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Verubecestat (MK-8931)浓度为1mM，配制在DMSO中。建议用本试剂盒提供的Assay Buffer对Verubecestat (MK-8931)进行稀释。使用本试剂盒检测Verubecestat (MK-8931)的抑制效果参考图2。

3. BACE1 Substrate的准备。

本试剂盒提供的BACE1 Substrate为20X溶液。使用Assay Buffer稀释BACE1 Substrate (20X) 20倍后即可得到1X BACE1 Substrate，例如取50μl BACE1 Substrate加入950μl Assay Buffer中，混匀即得1ml的BACE1 Substrate (1X)。每个反应需要加入100μl BACE1 Substrate (1X)。

注：BACE1 Substrate (1X)需现用现配，注意避光使用，不建议反复冻融。

4. 样品测定。

a. 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。

	Blank Control	100% Activity Control	Positive Control	Sample
Assay Buffer	90µl	80µl	80µl	80µl
BACE1 Enzyme	-	10µl	10µl	10µl
MK-8931	-	-	10µl	-
Sample Solvent	10µl	10µl	-	-
Sample	-	-	-	10µl
Total Volume	100µl			

注：Sample Solvent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。

- b. 各孔快速加入100µl BACE1 Substrate (1X)，混匀，避免产生气泡。

注：加入BACE1 Substrate后反应会立即开始，如果孔数较多的情况下，建议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。

- c. 使用多功能酶标仪37°C孵育并进行连续荧光测定。激发波长为325nm，发射波长为393nm，每5-10分钟进行检测，连续检测1至2小时。

注：也可在步骤4a中将待测样品加入后37°C预孵育5-10分钟，再将BACE1 Substrate (1X)加入反应体系中。建议通过预实验确定未知抑制剂比较适合的孵育时间。预孵育有可能可以促进抑制剂和酶的结合。

5. 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_{Blank Control}、RFU_{100% Activity Control}、RFU_{Positive Control}和RFU_{Sample}。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(Inhibitory rate) (%) = $(\text{RFU}_{100\% \text{ Activity Control}} - \text{RFU}_{\text{Sample}}) / (\text{RFU}_{100\% \text{ Activity Control}} - \text{RFU}_{\text{Blank Control}}) \times 100\%$ 。
- 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Verubecestat (MK-8931)对于人BACE1酶的抑制作用的检测结果参考图2，BACE1 Substrate (1X)加入反应体系中，37°C孵育60分钟进行荧光测定，Verubecestat (MK-8931)的IC₅₀约为32nM。

参考文献：

- Burns A, Iliffe S. BMJ. 2009. 338:b158.
- Shimizu H, Tosaki A, Kaneko K, Hisano T, Sakurai T, et al. Mol Cell Biol. 2008. 28(11):3663-71.
- Kennedy ME, Stamford AW, Chen X, Cox K, Cumming JN, et al. Sci Transl Med. 2016. 8(363):363ra150.
- Liu L, Lauro BM, Ding L, Rovere M, Wolfe MS, et al. Alzheimers Dement. 2019. 15(9):1183-1194.
- Kulas JA, Franklin WF, Smith NA, Manocha GD, Puig KL, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019. 316(1):E106-E120.
- Hunt CE, Turner AJ. FEBS J. 2009. 276(7):1845-59.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0362S	β-Secretase 1 (BACE1)活性荧光检测试剂盒	100次
P0362M	β-Secretase 1 (BACE1)活性荧光检测试剂盒	500次
P0363S	β-Secretase 1 (BACE1)抑制剂筛选试剂盒	100次
P0363M	β-Secretase 1 (BACE1)抑制剂筛选试剂盒	500次
P2520-10µg	Recombinant Active Human BACE1 (His-Tag)	10µg
P2520-100µg	Recombinant Active Human BACE1 (His-Tag)	100µg
P2520-1mg	Recombinant Active Human BACE1 (His-Tag)	1mg
P9739-0.5ml	MCA-EIDLMLVDK-Dnp (BACE1荧光底物)	2mM × 0.5ml
P9739-5mg	MCA-EIDLMLVDK-Dnp (BACE1荧光底物)	5mg
P9739-25mg	MCA-EIDLMLVDK-Dnp (BACE1荧光底物)	25mg
SF1183-10mM	Verubecestat (MK-8931) (BACE1/2抑制剂)	10mM × 0.2ml
SF1183-5mg	Verubecestat (MK-8931) (BACE1/2抑制剂)	5mg
SF1183-25mg	Verubecestat (MK-8931) (BACE1/2抑制剂)	25mg
SF1183-100mg	Verubecestat (MK-8931) (BACE1/2抑制剂)	100mg

Version 2023.06.21