

# ヒト ACE2 蛋白・His タグ (100μg)



Code No. HAK-ACE2\_UL-1

2020年8月1日作成

## バックグラウンド

アンジオテンシン変換酵素 2 (Angiotensin-converting enzyme 2、ACE2) は ACE ホモログとも呼ばれ、ACE とかなり相同性のある内在性膜タンパク質です。

ACE2 は血圧調節に関与するレニン・アンジオテンシン系で働く因子の一つとして知られていましたが、最近になり、COVID-19 の原因である新型コロナウイルスがヒトの細胞に感染する際、細胞膜に存在する ACE2 に結合してから細胞内に取り込まれることが明らかとなり、ACE2 は新型コロナウイルスの受容体でもあると考えられています。<sup>(1)</sup>

本試薬 (ヒト ACE2 蛋白・His タグ) を 96 穴プレートに固相し、ウイルス蛋白の受容体結合ドメインをウサギ Fc と結合させた融合蛋白である別売試薬の SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグまたはビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグを加え、HRP 標識した 2 次抗体やストレプトアビジンで検出させることで、高感度なバインディング・アッセイを提供します。

## 製品情報

### 1. タンパク質構造

ヒト ACE2 蛋白・His タグ (HAK-ACE2\_UL-1) は、ヒト・アンジオテンシン変換酵素 2 の細胞外領域に相当する Ser19-Pro738 の C 末端にポリヒスチジンタグを付けて HEK293 細胞で発現させ、Ni カラムを用いて精製したものが含まれています。

### 2. 純度

> 95% (SDS-PAGE)

### 3. 組成

ヒト ACE2 蛋白・His タグ 1mg/mL、0.1M-PBS (pH7.2~7.4)

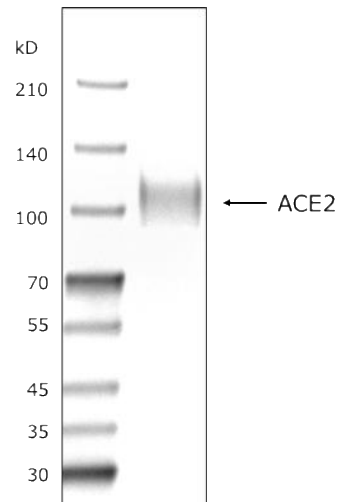
### 4. 保存

凍結融解の繰り返しは避けてください。

製品は受領時に -70°C 以下で保管して下さい。使用時に小分け分注を推奨します。

## 5. SDS-PAGE

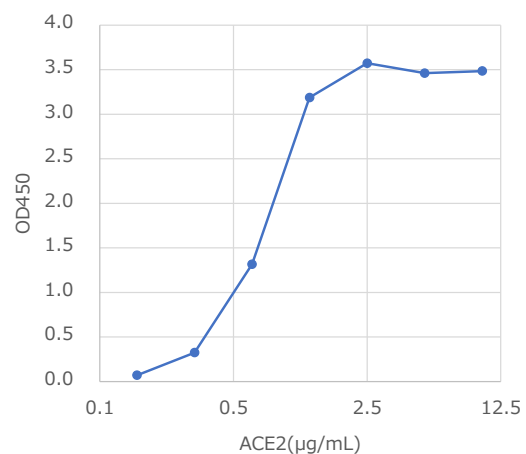
本製品 430ng を 4~20% グラジエント・ゲルで電気泳動し、CBB 染色した。



## 使用例

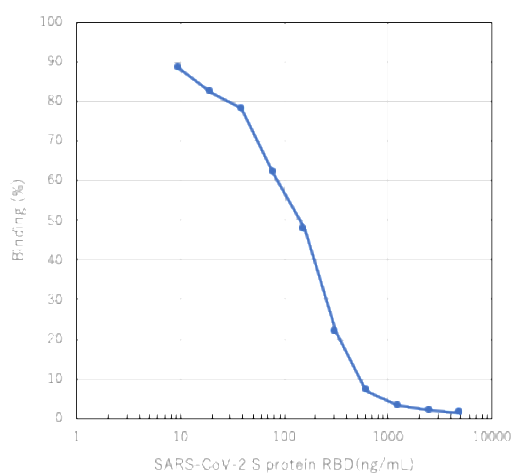
### 1. バインディング・アッセイ

0.156-10μg/mL で段階希釈したヒト ACE2 蛋白・His タグを 96 ウェル・プレートに固相し (100μL/ウェル)、0.8μg/mL のビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグを結合させ、HRP 標識ストレプトアビジンで検出した。この際の検量線において、線形範囲 (リニアレンジ) は 0.156-1.25μg/mL であった。



## 2. 競合法による結合阻害物質スクリーニング

固相化した 1 $\mu$ g/mL のヒト ACE2 蛋白・His タグ(100 $\mu$ L/ウェル)と 600ng/mL のビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグの結合反応に 10-5000ng/mL の結合阻害物質 (SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ)を添加し、HRP 標識ストレプトアビジンで検出した。この際の 50% 阻害濃度(IC50)は 140ng/mL(2.7nM)であった。



## 参考文献

- (1) Alexandra C. Walls, Young-Jun Park, et al., Cell 180, 1-12 (2020)

本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。

お問い合わせ先：株式会社ハカレル 〒567-0085 茨木市彩都あさぎ 7-7-18、TEL. 072-657-9980、 E-mail. info@hakarel.com

# SARS-CoV-2 スパイク蛋白と ACE2 との 結合実験プロトコール



Code No. HAK-SPD\_bio-1

2020年8月1日作成

Code No. HAK-SPD\_UL-1

Code No. HAK-ACE2\_UL-1

---

## 【実験1：バインディングアッセイ】

### 準備する試薬類

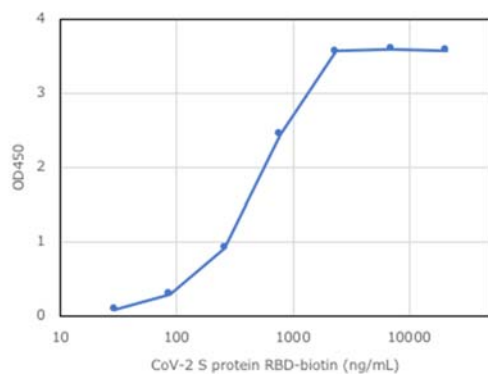
- ・ヒト ACE2 蛋白・His タグ
- ・ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ
- ・HRP 標識ストレプトアビジン
- ・プレート固相液：PBS (-)
- ・蛋白希釈液/ブロッキング液：1%BSA/ PBS (-)
- ・洗浄液：0.05%Tween20 を含む PBS(-)
- ・HRP 基質液：TMB など
- ・停止液：2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  
- ・96 穴プレート
- ・プレートシール
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー

### 試薬の調製方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグの希釈調製（1 ウェルあたり 100 $\mu$ L）  
PBS(-)で 1 $\mu$ g /mL に希釈する。
2. ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグの希釈調製（1 ウェルあたり 100 $\mu$ L）  
1%BSA/PBS(-)で 29-21000ng/mL に希釈する(3 倍ずつ段階希釈)。
3. HRP 標識ストレプトアビジンの希釈調製（1 ウェルあたり 100 $\mu$ L）  
1%BSA/PBS(-)で使用製品メーカー取扱説明書に従って、希釈する。

## 測定方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグを希釈調製する。
2. 96 穴プレートにヒト ACE2 蛋白・His タグを 1 ウェルあたり 100 $\mu$ L ずつプレートに加える。
3. 4 $^{\circ}$ Cで終夜、静置する。
4. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 $\mu$ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
5. 1%BSA/PBS(-)を 200 $\mu$ L ずつプレートに加える。
6. 室温で 2 時間あるいは 4 $^{\circ}$ Cで終夜、ブロッキングする。
7. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 $\mu$ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
8. 希釈調製したビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグを 1 ウェルあたり 100 $\mu$ L ずつプレートに加える。
9. 室温で 2 時間静置反応する。
10. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 $\mu$ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
11. 希釈調製した HRP 標識ストレプトアビジンを各ウェルあたり 100 $\mu$ L ずつプレートに加える。
12. 室温で静置反応する（反応時間は使用製品メーカーの取扱説明書に従う）。
13. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 $\mu$ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
14. 基質液を各ウェルに 100 $\mu$ L ずつ加え、室温で反応する。
15. 発色を確認後、各ウェルに 50 $\mu$ L ずつ停止液を加える。
16. プレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定する（測定波長：450nm）。



## 【実験2：競合法による結合阻害物質スクリーニング】

### 準備する試薬類

- ・ヒト ACE2 蛋白・His タグ
  - ・ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ
  - ・SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ
  - ・HRP 標識ストレプトアビジン
  - ・プレート固相液：PBS (-)
  - ・蛋白質希釈液/ブロッキング液：1%BSA/ PBS (-)
  - ・洗浄液：0.05%Tween20 を含む PBS(-)
  - ・HRP 基質液：TMB など
  - ・停止液：2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 
- ・96 穴プレート
  - ・プレートシール
  - ・プレートシェーカー
  - ・プレートリーダー

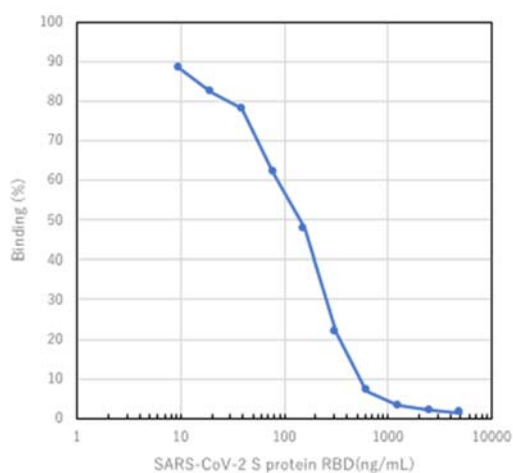
### 試薬の調製方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグの希釈調製（1 ウェルあたり 100 $\mu$ L）  
PBS(-)で 1 $\mu$ g/mL に希釈する。
2. ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグの希釈調製（1 ウェルあたり 50 $\mu$ L）  
1%BSA/PBS(-)で 1200ng/mL（終濃度 600ng/mL）に希釈する。
3. SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ（結合阻害蛋白質コントロール）の希釈調製（1 ウェルあたり 50 $\mu$ L）  
20-10000ng/mL（終濃度 10-5000ng/mL）の濃度範囲で希釈する（2 倍ずつ段階希釈）。
4. HRP 標識ストレプトアビジンの希釈調製  
1%BSA/PBS(-)で使用製品メーカー取扱説明書に従って、希釈する。

### 測定方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグを希釈調製する。
2. 96 穴プレートにヒト ACE2 蛋白・His タグを 1 ウェルあたり 100 $\mu$ L ずつプレートに加える。

- 4°Cで終夜、静置する。
- 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 $\mu$ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
- 1%BSA/PBS(-)を 1 ウェルあたり 200 $\mu$ L ずつプレートに加える。
- 室温で 2 時間あるいは 4°Cで終夜、ブロッキングする。
- 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 $\mu$ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
- 希釈調製したビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc を 1 ウェルあたり 50 $\mu$ L ずつプレートに加える。
- 結合阻害コントロールである SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc または評価する検体を 1 ウェルあたり 50 $\mu$ L ずつプレートに加える。
- 室温で 2 時間静置反応する。
- 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 $\mu$ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
- 希釈調製したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを各ウェルあたり 100 $\mu$ L ずつプレートに加える。
- 室温で静置反応する（反応時間は使用製品メーカーの取扱説明書に従う）。
- 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 $\mu$ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
- 基質液を各ウェルに 100 $\mu$ L ずつ加え、室温で反応する。
- 発色を確認後、各ウェルに 50 $\mu$ L ずつ停止液を加える。
- プレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定する（測定波長：450nm）。
- 阻害物質の添加による吸光度の低下を検出する。



# Human ACE2, His Tag (100µg)



Code No. HAK-ACE2\_UL-1

Created on August 1, 2020

## Background

Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), also called ACE homolog, is a membrane protein considerably homologous to ACE.

ACE2 was known as a factor in the renin-angiotensin system involved in blood pressure regulation.

Recently, it was clarified that the Spike glycoprotein of SARS-CoV-2 binds to ACE2 present on the cell membrane and then the virus is taken up into the cell when the infection occurs. Therefore, ACE2 is considered as a receptor for SARS-CoV-2 <sup>(1)</sup>.

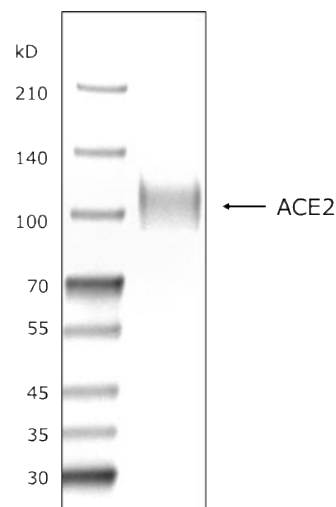
As shown in the usage example, a highly sensitive binding assay can be performed by this product (HAK-ACE2\_UL-1) and the receptor binding domain of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein (HAK-SPD\_UL-1, HAK-SPD\_bio-1).

The product must be stored at -70°C or lower upon receipt.

It is recommended to make small aliquots when using.

## 1. SDS-PAGE

430ng of the product was electrophoresed on 4~20% gradient gel and stained with CBB.



## Product information

### 1. Protein Construction

Human ACE2, His Tag (HAK-ACE2\_UL-1) contains Gln18-Pro738 of human ACE2 protein tagged with polyhistidine residues at its C-terminus. The protein was expressed and secreted from HEK293 cells, followed by the purification using a Ni column.

### 2. Purity

> 95% (SDS-PAGE)

### 3. Composition

Human ACE2, His Tag 1mg/mL,  
0.1M-PBS(pH7.2~7.4)

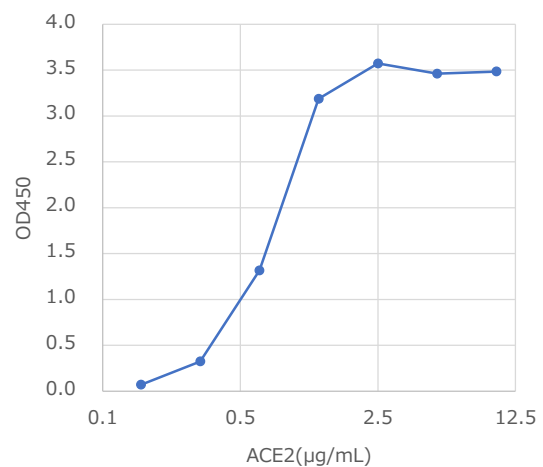
### 4. Storage:

Please avoid repeated freeze-thaw cycles.

## Usage example

### 1. Binding assay

Human ACE2 His tag was immobilized in a 96-well plate by adding at serial dilution of 0.156-10µg/mL. Then 0.8µg/mL of biotin labeled SARS-CoV-2

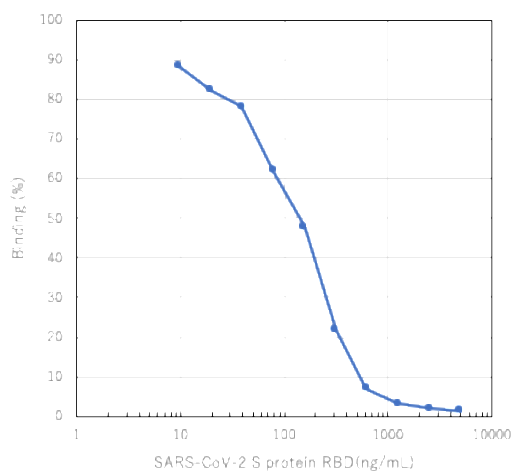


Spike glycoprotein Receptor-binding

domain, Rabbit IgG1 Fc Tag was added to the wells. The binding was detected with HRP-labeled streptavidin. The linear range in the standard curve was 0.156-1.25µg/mL. Detail protocol for the binding assay is provided separately.

## 2. Screening for the binding inhibitors by competition assay

Human ACE2 His tag was immobilized in a 96-well plate by adding at 1µg/mL. Then 600ng/mL biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein Receptor-binding domain, Rabbit IgG1 Fc tag and a binding inhibitor (SARS-CoV-2 Spike glycoprotein Receptor-binding domain, Rabbit IgG1 Fc tag in this case) were added to the well and the binding was detected by HRP-labeled streptavidin. The IC<sub>50</sub> was 140ng/mL (2.7nM).



## References

- (1) Alexandra C. Walls, Young-Jun Park, et al., Cell 180, 1-12 (2020)



# Protocol for the binding assay of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein and ACE2



Code No. HAK-SPD\_bio-1

Code No. HAK-SPD\_UL-1

Code No. HAK-ACE2\_UL-1

August 1, 2020

---

## 【Experiment 1, binding assay】

### Reagents

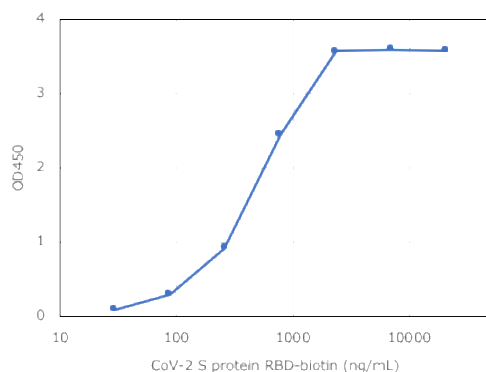
- Human ACE2, His Tag
- Biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag
- HRP-labeled streptavidin
- Immobilization buffer : PBS (-)
- Dilution buffer/Blocking buffer : 1%BSA/ PBS (-)
- Washing buffer : PBS(-) containing 0.05%Tween20
- HRP substrate : TMB etc.
- Stopping solution : 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  
- 96-well plate
- Plate seal
- Plate shaker
- Plate reader

### Preparation of reagents

1. Dilute human ACE2, His Tag with PBS(-) to 1 μg /mL. 100 μL of the solution is needed per well.
  
2. Dilute biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag with 1%BSA/PBS(-) to 29-21000ng/mL (serial dilution by three-fold). 100 μL of the solution is needed per well.
  
3. Dilute HRP-labeled streptavidin according to manufacturer's manual. 100 μL of the solution is needed per well.

### Method for the measurement

1. Dilute human ACE2, His Tag.
2. Add 100  $\mu\text{L}$ /well of human ACE2 in 96-well plate.
3. Stand at 4°C overnight.
4. Remove the reagent completely and add 300 $\mu\text{L}$ /well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
5. Add 200 $\mu\text{L}$  /well of 1%BSA/PBS(-).
6. As a blocking procedure, stand the plate at room temperature for 2 hours or at 4°C overnight.
7. Remove the reagent completely and add 300 $\mu\text{L}$ /well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
8. Add 100 $\mu\text{L}$ /well of diluted biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag.
9. Stand at room temperature for 2 hours.
10. Remove the reagent completely and add 300 $\mu\text{L}$ /well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
11. Add 100 $\mu\text{L}$ /well of diluted HRP-labeled streptavidin.
12. Stand at room temperature (reaction time should be referred to the manufacturer's manual) .
13. Remove the reagent completely and add 300 $\mu\text{L}$ /well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
14. Add 100 $\mu\text{L}$ /well of substrate solution to react at room temperature.
15. When the color developed, add 50 $\mu\text{L}$ /well of stopping solution.
16. Measure the optical density (OD450) of each well by plate reader.



## 【Experiment 2 : Screening for the binding inhibitors by competition assay】

### Reagents

- Human ACE2, His Tag
  - Bioin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag
  - SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag
  - HRP-labeled streptavidin
  - Immobilization buffer : PBS (-)
  - Dilution buffer/Blocking buffer : 1%BSA/ PBS (-)
  - Washing buffer : PBS(-) containing 0.05%Tween20
  - HRP substrate : TMB etc.
  - Stopping solution : 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 
- 96-well plate
  - Plate seal
  - Plate shaker
  - Plate reader

### Preparation of reagents

1. Dilute human ACE2, His Tag with PBS(-) to 1μg /mL. 100 μL of the solution is needed per well.
2. Dilute biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag with 1%BSA/PBS(-) to 1200ng/mL. 50 μL of the solution is needed per well to make final concentration of 600ng/mL.
3. Dilute SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag with 1%BSA/PBS(-) to 20-10000ng/mL (serial dilution by two-fold) to make final concentration of 10-5000ng/mL.
4. Dilute HRP-labeled streptavidin according to manufacturer's manual.

### Method for the measurement

1. Dilute human ACE2, His Tag.
2. Add 100 μL/well of human ACE2 in 96-well plate.
3. Stand at 4°C overnight.
4. Remove the reagent completely and add 300μL/well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
5. Add 200μL /well of 1%BSA/PBS(-).
6. As a blocking procedure, stand the plate at room temperature for 2 hours or at 4°C

overnight.

7. Remove the reagent completely and add 300 $\mu$ L/well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
8. Add 50 $\mu$ L/well of diluted biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag.
9. Add 50 $\mu$ L/well of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag as a control inhibitor or any inhibitor samples to be tested.
10. Stand at room temperature for 2 hours.
11. Remove the reagent completely and add 300 $\mu$ L/well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
12. Add 100 $\mu$ L/well of diluted HRP-labeled streptavidin.
13. Stand at room temperature (reaction time should be referred to the manufacturer's manual).
14. Remove the reagent completely and add 300 $\mu$ L/well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
15. Add 100 $\mu$ L/well of substrate solution to react at room temperature.
16. When the color developed, add 50 $\mu$ L/well of stopping solution.
17. Measure the optical density (OD450) of each well by plate reader.
18. Check for the decrease in the absorbance caused by the binding inhibitors.

