

## 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性检测试剂盒

微量法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

货号：D100300

规格：100T/48S

### 产品内容：

提取液：液体 70mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 5.2mL 试剂一，充分震荡溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 2.6mL 试剂一，充分震荡溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 5mL 蒸馏水溶解备用。

### 产品说明：

AChE 属于丝氨酸水解酶，广泛存在于各种动物组织和血清中。AChE 催化乙酰胆碱 (Ach) 水解，在神经传导调节中起重要作用。

AChE 催化 Ach 水解生成胆碱，胆碱与二硫对硝基苯甲酸 (DTNB) 作用生成 5-巯基-硝基苯甲酸 (TNB)；TNB 在 412nm 处有吸收峰，通过测定 412 nm 吸光度增加速率，计算 AChE 活性。

### 自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96 孔板，匀浆器/研钵，蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，8000g 4℃ 离心 10min，取上清液待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 ( $10^4$  个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

#### 二、测定操作：

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
2. 操作表：

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	15	15
试剂二	50	-
37℃ 水浴准确反应 5min。		
试剂四	50	50

试剂二	-	50
混匀后 12000rpm 常温离心 5min。分别吸取 10 $\mu$ L 上清液于新的 EP 管或 96 孔板中，之后分别加入。		
试剂一	170	170
试剂三	20	20
混匀，放置 2min 后于微量玻璃比色皿中或 96 孔板中测定 412nm 处的吸光度，记为 A 测定管，A 对照管，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

### 三、AchE 活性计算公式：

#### 一、用微量玻璃比色皿测定的计算公式：

##### 1. 组织 AchE 活性

###### (1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol TNB 为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(U/mg prot)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{显色}} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{酶促}}) \div T \\ = 2255 \times \Delta A \div \text{Cpr}。$$

###### (2) 按照样本质量计算

活性单位定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol TNB 为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(U/g)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{显色}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{酶促}}) \div T \\ = 2255 \times \Delta A \div W。$$

##### 2. 细菌、细胞 AchE 活性

活性单位定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化产生 1nmol TNB 为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{显色}} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{酶促}}) \div T \\ = 2255 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

##### 3. 血清 AchE 活性

活性单位定义：每毫升血清每分钟催化产生 1nmol TNB 为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(U/mL)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{显色}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{酶促}}) \div T = 2255 \times \Delta A$$

$\epsilon$ : TNB 摩尔消光系数, 13.6 $\times 10^3$  L/mol/cm;  $V_{\text{显色}}$ : 显色反应体系总体积 (L), 1 mL=2 $\times 10^{-4}$ L; 10<sup>9</sup>: 1mol=1 $\times 10^9$ nmol;  $V_{\text{酶促}}$ : 酶促反应总体积, 0.115mL;  $V_{\text{上清}}$ : 吸取上清液体积, 0.01mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 蛋白浓度 (mg/mL); W: 样本质量, g;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积 (mL), 0.015mL; T: 反应时间 (min), 5min; 细胞数量: 提取时的细胞数量, 万个。

#### 二、用 96 孔板测定的计算公式：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm 进行计算即可。

#### 注意事项：

- 1.测定过程中样本和工作液在冰上放置，以免变性和失活。
- 2.当吸光值大于 1 时，建议将样本稀释后测定。