

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

乙酰胆碱酯酶 (AChE, EC.3.1.1.7) 是生物体内保证神经信号正常传递的关键酶, 在神经传导调节中起重要作用。

乙酰胆碱酯酶催化乙酰胆碱 (AChE) 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 吸光度增加速率即可得出 AChE 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配置:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.5mL 乙醇, 充分溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×2 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 每支再加 1.2mL 蒸馏水, 充分震荡溶解。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪。

四、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30 min, 调节波长到 412 nm。

② 所有试剂可于 37°C水浴中孵育 20min 以上。在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	150
试剂二	10
试剂三	20
混匀, 37°C条件下反应, 30s 时于 412nm 处读取吸光值 A1, 5min30s 读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】1.加完试剂三反应即启动；若 A1 值大于 1 或 ΔA 大于 1，可减少样本体积 V1（如由 20 μ L 减至 10 μ L，则试剂一相应增加），或减少反应时间 T（如由 5min30s 减至 2min30s 读 A2），则改变后的 V1 和 T 重新代入公式计算。

2.若 ΔA 低于 0.01，可增加样本取样量 W（如 0.2g），或加大样本体积 V1（如由 20 μ L 增至 40 μ L，则试剂一相应减少），或延长反应时间 T（如由 5min30s 增至 15min30s 或更长读 A2），则改变后的 W 和 V1 和 T 重新代入公式计算。

五、结果计算：

1. 按照蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol TNB 的酶量为 1 个酶活单位。

AChE 酶活(nmol/min/mg prot)=($\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9$) \div (Cpr \times V1) \div T=294.12 \times $\Delta A \div$ Cpr

2. 按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol TNB 的酶量为 1 个酶活单位。

AChE 酶活(nmol/min/g 鲜重)=($\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9$) \div (W \times V1 \div V) \div T=294.12 \times $\Delta A \div$ W

3. 细菌、细胞 AchE 活性：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1nmol TNB 的酶量为 1 个酶活单位。

AChE 酶活(nmol/min/10⁴ cell)=($\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9$) \div (500 \times V1 \div V) \div T=0.6 \times ΔA

4. 液体中 AchE 活性：

酶活定义：每毫升血清每分钟催化产生 1nmol TNB 的酶量为 1 个酶活单位。

AChE 酶活(nmol/min /mL)=($\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9$) \div V1 \div T=294.12 \times ΔA

ϵ ---TNB 摩尔消光系数，13.6 \times 10³ L/mol/cm；

d---96 孔板光径，0.5 cm；

V---提取液体积，1 mL；

V1---加入上清液体积，0.02 mL；

V2---反应体系总体积，200 μ L=2 \times 10⁻⁴L；

T---反应时间，5min；

W---样本取样质量，g；

500---细菌或细胞数量，万；

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL)；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。