

乙酰胆碱酯酶(AchE)活性检测试剂盒说明书

Acetylcholinesterase Assay Kit

微量法

货号: AK339

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES40	液体 100ml×1 瓶	4℃保存;
AK339-A	液体 20ml×1 瓶	4℃保存; 临用前置于 37℃水浴中预热 30min。
AK339-B	粉剂×1 支	4℃保存。临用前加入 1.3 mL AK339-A, 充分震荡溶解。
AK339-C	粉剂×1 支	4℃保存。临用前加入 1.3 mL AK339-A, 充分震荡溶解。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 乙酰胆碱酯酶 (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。

原理: 乙酰胆碱酯酶催化 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, 计算乙酰胆碱酯酶活性。

自备用品:

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

粗酶液提取:

1. 细菌、真菌或培养细胞: 按照细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES40 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液 ES40), 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。
2. 组织: 按照组织质量(g): 提取液 ES40 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 ES40), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清等液体: 直接测定。

测定步骤

1. 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. AK339-A 置于 37℃水浴中预热 30min。
3. 取微量石英比色皿/96 孔板, 依次按下表加入:

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
蒸馏水	20	
AK339-A	160	
AK339-B	10	
AK339-C	10	
迅速混匀, 于 412nm 处测定 3min 内吸光值变化, 第 10s 吸光值记为 A1, 第 190s 吸光值记为 A2, ΔA 空白管=A2-A1。		
样品上清液		20
AK339-A		160

AK339-B		10
AK339-C		10
迅速混匀，于 412nm 处测定 3min 内吸光值变化，第 10s 吸光值记为 A3，第 190s 吸光值记为 A4， ΔA 测定管=A4-A3。		

注意：空白管只需测定 1-2 次。

乙酰胆碱酯酶活性计算

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 245 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(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 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(nmol/min/g)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 245 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

2. 细菌、真菌或培养细胞 AchE 活性

活性单位定义：每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol TNB 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 245 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(nmol/min /mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div \times V \text{ 样} \div T \\ = 245 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

注： ϵ ：TNB 摩尔消光系数， 13.6×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm；V 反总：反应体系总体积 (L)， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L；V 样总：提取液体积，1 mL； 10^6 ： $1 \text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ；Cpr：蛋白浓度 (mg/mL)；V 样：加入上清液体积 (mL)，0.02 mL；W：样品质量；T：反应时间 (min)，3 min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

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 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 490 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(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 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(nmol/min/g)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 490 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

2. 细菌、真菌或培养细胞 AchE 活性

活性单位定义：每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol TNB 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 490 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AchE 酶活(nmol/min /mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div \times V \text{ 样} \div T$$

$$= 490 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr}$$

注： ϵ ：TNB 摩尔消光系数， $13.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：96 孔板光径， 0.5 cm ； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积 (L)， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积， 1 mL ； 10^6 ： $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ； Cpr ：蛋白浓度 (mg/mL)； $V_{\text{样}}$ ：加入上清液体积 (mL)， 0.02 mL ； W ：样品质量； T ：反应时间 (min)， 3 min 。

注意事项：

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴乳胶手套操作。
2. 蛋白含量测定可选用 Bioass 提供的 BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))。