

## 乙酰酯酶（Acetylcholinesterase, AE）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0718W 微板法 48 样）

### 一、产品简介：

乙酰酯酶（EC 3.1.1.6, AE）已被证明是消除饲料细胞壁中阿魏酸等酚酸类木质素的关键酶。可与其他细胞壁降解酶协同作用共同促进饲料等细胞壁的降解。

本试剂盒采用乙酰酯酶（AE）分解底物对-硝基苯乙酯生成对-硝基苯酚（PNP），后者在 405nm 有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算乙酰酯酶（AE）活性。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×2 支	4°C保存	临用前每支加 0.6mL 无水乙醇混匀溶解，仍 4°C保存。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

### 四、乙酰酯酶（AE）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：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 15min，取上清液待测。

【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<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：可直接测定，或者适当稀释后测定。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30 min，调节波长为 405nm。

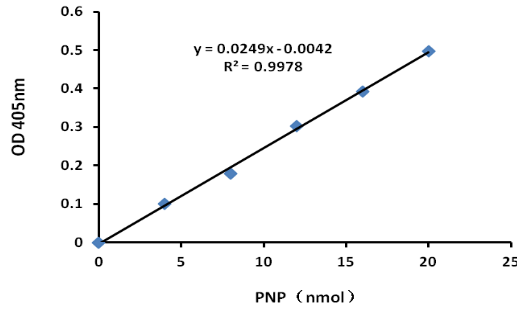
- ② 所有试剂于 25°C水浴中预热 10 min。

- ③ 在 EP 管中依次加入下列试剂：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	220	240
试剂二	20	
混匀，40°C孵育 30min。		
试剂三	60	60
混匀，取 200μL 上清液至 96 孔板中（若有浑浊可 8000rpm 离心 5min 后取上清），于 405nm 读取 A 值， $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ （每个样本做一个自身对照）。		

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0249x - 0.0042$ ， $x$  是 PNP 摩尔质量 (nmol)； $y$  是  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟水解底物产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$$AE \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0042) \div 0.0249] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 13.4 \times (\Delta A + 0.0042) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟水解底物产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$$AE \text{ (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0042) \div 0.0249] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 13.4 \times (\Delta A + 0.0042) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每  $10^4$  个细胞每分钟水解底物产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$$AE \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0042) \div 0.0249] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.03 \times (\Delta A + 0.0042) \times D$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟水解底物产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$$AE \text{ (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0042) \div 0.0499] \div V1 \div T = 13.4 \times (\Delta A + 0.0042)$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积 (mL)，0.1mL；

T---反应时间，30 min。

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (10 $\mu$ mol/mL)：向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2  $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据对照管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。