

## 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定试剂盒说明书

(货号: G0907W 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	使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	使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, $\Delta A=A2-A1$ 。	

## 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。

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

### 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。

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

### 3. 细菌、细胞 AchE 活性：

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

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell})=(\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (500 \times V1 \div V) \div T=0.6 \times \Delta A$$

### 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。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol/min /mL})=(\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div V1 \div T=294.12 \times \Delta A$$

$\varepsilon$ ---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;

$V$ ---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,  $200\mu\text{L}=2 \times 10^{-4}\text{L}$ ;

$T$ ---反应时间, 5min;

$W$ ---样本取样质量, g;

500---细菌或细胞数量, 万;

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