

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性检测试剂盒 (微量法) (本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0362	乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性检测试剂盒	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 ×1 瓶	4°C
试剂二	液体 ×1 瓶	4°C
试剂三	粉剂×1 瓶: 临用前加入 1.3mL 试剂二, 充分震荡溶解。	4°C
试剂三	粉剂×1 瓶: 临用前加入 1.3mL 试剂二, 充分震荡溶解。	-20°C

一、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。

二、自备材料

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪和蒸馏水。

三、样本准备:

- 1、组织: 按照组织质量 (g): 试剂一 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 试剂一 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、血清 (浆) 等液体样品: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂二置于 37°C 水浴中预热 30min。
- 3、空白管: 取微量石英比色皿/96 孔板, 依次加入 20 μ L 蒸馏水、160 μ L 试剂二、10 μ L 试剂三和 10 μ L 试剂四, 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。△A 空白管=A2-A1。
- 4、测定管: 取微量石英比色皿/96 孔板, 依次加入 20 μ L 上清、160 μ L 试剂二、10 μ L 试

剂三和 10 μ L 试剂四, 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。△A 空白管=A4-A3。

注: 空白管只需测一次。

五、AchE 活力的计算

用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、按照组织样本蛋白浓度计算:

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。

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按照组织样本鲜重计算

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。

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

3、按照细菌/细胞密度计算:

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

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

4、按照血清/血浆体积计算

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。

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

ϵ : TNB 摩尔消光系数, 13.6 \times 10³ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), 200 μ L=2 \times 10⁻⁴L; V 样总: 提取液体积, 1 mL; 106: 1mol=1 \times 10⁶ μ 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。

用96孔板测定的计算公式如下

1、按照组织样本蛋白浓度计算

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。

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按照组织样本鲜重计算

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。

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

3、按照细菌/细胞密度计算

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。

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

4、按照血清/血浆体积计算

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。

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

ϵ : TNB 摩尔消光系数, 13.6×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 0.5 cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{L}$; 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。