

乙酰胆碱酯酶（AChE）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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。

自备实验用品及仪器：

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1支，4℃保存。临用前加入1.3 mL试剂二，充分震荡溶解。

试剂四：粉剂×1支，4℃保存。临用前加入1.3 mL试剂二，充分震荡溶解。

粗酶液提取：

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℃离心10min，取上清液待测。

细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL试剂一），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。

血清等液体：直接测定。

乙酰胆碱酯酶（AChE）活性测定试剂盒说明书测定操作：

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. 试剂二置于37℃水浴中预热30min。
3. 取微量石英比色皿/96孔板，依次加入20μL上清液、160 μL试剂二、10μL试剂三和10μL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。 ΔA 测定管=A2-A1。

AChE活性计算：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

AChE酶活(nmol/min/mg prot)=($\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9$) \div (Cpr \times V样) \div T

$$= 245 \times \Delta A \div Cpr$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 245 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

细菌、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。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 245 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 245 \times \Delta A \end{aligned}$$

ε : TNB摩尔消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d : 比色皿光径, 1 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。

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。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 490 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 490 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

2. 细菌、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。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 490 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

AchE酶活(nmol/min /mL)= $(\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T$

$$=490 \times \Delta A$$

ϵ : TNB摩尔消光系数, 13.6×10^3 L/mol/cm; d : 96孔板光径, 0.5 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 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。

www.pyram.cn