

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0384

Size: 100T/96S

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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412nm吸光度增加速率,计算AChE活性。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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

五、粗酶液提取：

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℃离心10min，取上清液待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴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。
3. 血清等液体：直接测定。

六、测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，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. 空白管：取微量石英比色皿/96孔板，依次加入20 μL蒸馏水、160 μL试剂二、10 μL试剂三和10 μL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 μL上清液、160 μL试剂二、10 μL试剂三和10 μL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。ΔA测定管=A4-A3

注意：空白管只需测定一次。

七、AChE 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。

$$\text{AChE 酶活 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 245 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

（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。

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

2. 细菌、细胞AChE活性

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。

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

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。

$$\text{AChE 酶活 (nmol/min /mL)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 245 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

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

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

ϵ : TNB 摩尔消光系数, 13.6×10^3 L/mol/cm; d: 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 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; 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。