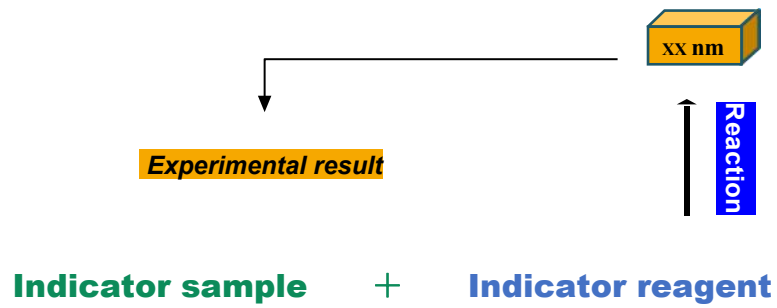


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定试剂盒说明书

### 微量法

**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412nm吸光度增加速率，计算AChE活性。

自备仪器和用品：

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。

试剂组成和配制：

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

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 (10<sup>4</sup>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。

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。  
 $\Delta A_{\text{空白管}} = A2 - A1$
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。  
 $\Delta A_{\text{测定管}} = A4 - A3$

**注意：**空白管只需测定一次。

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。

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

(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。

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

2. 细菌、细胞AchE活性

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

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

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。

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

$\epsilon$ : TNB 摩尔消光系数,  $13.6 \times 10^3$  L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积 (L),  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$  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.

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。

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

$\epsilon$ : TNB 摩尔消光系数,  $13.6 \times 10^3$  L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5 cm; V 反总: 反应体系总体积 (L),  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$  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.