

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) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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。

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体×1瓶	4℃保存	-
试剂一	液体×1瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1瓶	4℃保存	临用前加入2.6mL试剂一，充分震荡溶解
试剂三	粉剂×1瓶	4℃保存	临用前加入2.6mL试剂一，充分震荡溶解

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。

自备仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、1mL玻璃比色皿和蒸馏水。

操作步骤：

一、粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）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 提取液），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。

二、测定操作：

1. 分光光度计预热 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. 空白管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100 μL 蒸馏水、800 μL 试剂一、50 μL 试剂二和 50 μL 试剂三，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

测定管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100 μL 上清液、800 μL 试剂一、50 μL 试剂二和 50 μL 试剂三

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。

二、AChE活性计算公式：

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。

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

ϵ ：TNB摩尔消光系数， 13.6×10^3 L/mol/cm；V反总：反应体系总体积 (L)，1 mL=0.001 L； 10^6 ：1mol= 1×10^6 μ mol；V样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：蛋白浓度 (mg/mL)；W：样本质量，g；V样：加入上清液体积 (mL)，0.1 mL；T：反应时间 (min)，3 min。