

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-ZM001 分光法 48 样)

一、产品简介:

乙酰胆碱酯酶 (AChE, EC.3.1.1.7) 是生物体内保证神经信号正常传递的关键酶, 在神经传导调节中起重要作用。

乙酰胆碱酯酶催化乙酰胆碱 (AChE) 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 吸光度增加速率即可得出 AChE 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配置:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 35 mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 3mL 乙醇, 充分溶解备用。
试剂三	粉剂 2 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 每支再加 1.2mL 蒸馏水, 充分震荡溶解。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪。

四、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30 min, 调节波长到 412 nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂可于 37°C 水浴中孵育 20min 以上。在 1mL 玻璃比色皿中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	640
试剂二	40
试剂三	40
混匀, 37°C 条件下反应, 30s 时于 412nm 处读	

取吸光值 A1, 5min30s 读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。

【注】1.加完试剂三反应即启动;若 A1 值大于 1 或 ΔA 大于 1, 可减少样本体积 V1 (如由 60 μ L 减至 20 μ L, 则试剂一相应增加), 或减少反应时间 T (如由 5min30s 减至 2min30s 读 A2), 则改变后的 V1 和 T 重新代入公式计算。

2.若 ΔA 低于 0.01, 可增加样本取样量 W (如 0.2g), 或加大样本体积 V1 (如由 60 μ L 增至 120 μ L, 则试剂一相应减少), 或延长反应时间 T (如由 5min30s 增至 15min30s 或更长读 A2), 则改变后的 W 和 V1 和 T 重新代入公式计算。

五、结果计算:

1. 按照蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol TNB 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=(\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V1) \div T=191.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每分钟催化产生 1nmol TNB 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=(\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (W \times V1 \div V) \div T=191.2 \times \Delta A \div W$$

3. 细菌、细胞 AchE 活性:

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

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=(\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (500 \times V1 \div V) \div T=0.38 \times \Delta A$$

4. 液体中 AchE 活性:

酶活定义: 每毫升血清每分钟催化产生 1nmol TNB 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=(\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div V1 \div T=191.2 \times \Delta A$$

ε ---TNB 摩尔消光系数, 13.6 $\times 10^3$ L/mol/cm;

d---光径, 1cm;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---加入上清液体积, 0.06 mL;

V2---反应体系总体积, 780 μ L=7.8 $\times 10^{-4}$ L;

T---反应时间, 5min;

W---样本取样质量, g;

500---细菌或细胞数量, 万;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL); 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。