

乙酰胆碱酯酶（AChE）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-ZM001 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.5mL 乙醇，充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉剂 2 支	4℃避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支再加 1.2mL 蒸馏水，充分震荡溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、乙醇、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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℃×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℃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（10⁴）：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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 412 nm。

② 所有试剂可于 37°C 水浴中孵育 20min 以上。在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	150
试剂二	10
试剂三	20
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 20μL 减至 10μL, 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 20μL 增至 40μL, 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。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 294.12 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (W \times V1 \div V) \div T = 294.12 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.6 \times \Delta A$$

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。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div V1 \div T = 294.12 \times \Delta A$$

ε ---TNB 摩尔消光系数, 13.6×10³ L/mol/cm;

d---96 孔板光径, 0.5 cm;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---加入上清液体积, 0.02 mL;

V2---反应体系总体积, 200μL=2×10⁻⁴L;

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。