

乙酰胆碱酯酶(AchE)活性检测试剂盒说明书

Acetylcholinesterase Assay Kit

分光光度法

货号: AK338

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES40	液体 50ml×1 瓶	4℃保存;
AK338-A	液体 50ml×1 瓶	4℃保存; 临用前置于 37℃水浴中预热 30min。
AK338-B	粉剂×1 支	4℃保存; 临用前加入 2.6mL AK338-A, 充分震荡溶解。
AK338-C	粉剂×1 支	4℃保存; 临用前加入 2.6mL AK338-A, 充分震荡溶解。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 乙酰胆碱酯酶(AchE)属于丝氨酸水解酶, 广泛存在于各种动物组织和血清中。Ach 催化乙酰胆碱(Ach)水解, 在神经传导调节中起重要作用。

原理: 乙酰胆碱酯酶催化 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, 计算乙酰胆碱酯酶活性。

自备用品:

可见分光光度计、1ml 玻璃比色皿、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、研钵/匀浆器和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 细菌、真菌或培养细胞: 按照细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES40 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液 ES40), 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。
2. 组织: 按照组织质量(g): 提取液 ES40 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 ES40), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清等液体: 直接测定。

测定步骤

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. AK338-A 置于 37℃水浴中预热 30min。
3. 取 1mL 玻璃比色皿, 依次按下表加入:

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
蒸馏水	100	
AK338-A	800	
AK338-B	50	
AK338-C	50	
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		
样品上清液		100
AK338-A		800

AK338-B		50
AK338-C		50
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。

乙酰胆碱酯酶活性计算

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。

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。

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。

AchE 酶活(nmol/min/ 10^4 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。

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

注： 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。

注意事项：

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴乳胶手套操作。
2. 蛋白含量测定可选用 Bioss 提供的 BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))。