

乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AchE) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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 412 nm 吸光度增加速率, 计算 AchE 活性。

组成:

产品名称	ES001-50T/48S	Storage
提取液: 液体	1 瓶	4°C
试剂一: 液体	1 瓶	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4°C 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°C 保存。临用前加入 2.6ml 试剂一, 充分震荡溶解。

自备仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

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°C 离心 10min, 取上清液待测。
2. 细菌、真菌: 按照细胞数量 (10^4 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°C, 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:

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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°C 水浴中预热 30min。
3. 取 1ml 玻璃比色皿, 依次加入 **100 μ l 上清液**、800 μ l 试剂一、50 μ l 试剂二和 50 μ l 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 测定管=A2-A1。

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。

$$\begin{aligned}\text{AchE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 245 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\text{AchE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 245 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{AchE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 245 \times \Delta A \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{AchE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div V \text{ 样} \div T \\ &= 245 \times \Delta A\end{aligned}$$

ϵ : TNB 摩尔消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; V 反总: 反应体系总体积 (L), $1 \text{ ml} = 0.001 \text{ L}$; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$;
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。

