

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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	ES002-100T/96S	Storage
试剂一：液体	1 瓶	4°C
试剂二：液体	1 瓶	4°C
试剂三：粉剂	1 支	4°C
试剂四：粉剂	1 支	4°C
说明书	一份	

试剂三：粉剂×1 支，4°C 保存。临用前加入 1.3 ml 试剂二，充分震荡溶解。

试剂四：粉剂×1 支，4°C 保存。临用前加入 1.3 ml 试剂二，充分震荡溶解。

自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪和蒸馏水。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (ml) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1ml 试剂一）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 试剂一），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/酶标仪预热 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. 取微量石英比色皿/96 孔板，依次加入 20μl 上清液、160 μl 试剂二、10μl 试剂三和 10μl 试剂四，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：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

(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。

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

2. 细菌、细胞 AchE 活性

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

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

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。

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

ε : TNB 摩尔消光系数, 13.6×10³ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), 200μl=2×10⁻⁴L; V 样总: 提取液体积, 1 ml; 10⁶: 1mol=1×10⁶μmol; Cpr: 蛋白浓度 (mg/ml); V 样: 加入上清液体积 (ml), 0.02 ml; W: 样品质量; T: 反应时间 (min), 3 min。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

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。

$$\begin{aligned}\text{AchE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 490 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\text{AchE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 490 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

2. 细菌、细胞 AchE 活性

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

$$\begin{aligned}\text{AchE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 490 \times \Delta A \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$



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。

$$\text{AchE 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T \\ = 490 \times \Delta A$$

ϵ : TNB 摩尔消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d : 96 孔板光径, 0.5 cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{l} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 ml ; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 蛋白浓度 (mg/ml); $V_{\text{样}}$: 加入上清液体积 (ml), 0.02 ml ; W : 样品质量; T : 反应时间 (min), 3 min 。

