

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体×1 瓶，4℃ 保存。

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

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℃ 离心 10min，取上清液待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴ 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℃，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：

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℃ 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。

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

(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。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 245 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 245 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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。

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

$$= 245 \times \Delta A$$

ϵ : TNB 摩尔消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1 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。

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。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol/min/mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 490 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 490 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{AChE 酶活}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 490 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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。

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

$$= 490 \times \Delta A$$

ϵ : TNB 摩尔消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; 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。