

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性检测试剂盒

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2025

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前取 1 瓶加入 2.6 mL 试剂一充分震荡溶解，用不完的 2-8℃保存一周；

产品说明：

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。

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 412nm 吸光度增加速率，计算 AChE 活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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℃离心 10min，取上清液待测。
2. 细菌、细胞：按照细胞数量 (10⁴ 个)：提取液体积 (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℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，分光光度计蒸馏水调零。

2. 样本测定:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	15	15
试剂二	50	-
37°C 水浴准确反应5min。		
试剂四	50	50
试剂二	-	50
混匀后12000rpm常温离心5min。分别吸取10μL上清液于新的EP管或96孔板中，之后分别加入。		
试剂一	170	170
试剂三	20	20
混匀，放置2min后于微量玻璃比色皿中或96孔板中测定412nm处的吸光度，记为A测定管，A对照管，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

三、AChE 酶活计算公式

A、用微量玻璃比色皿测定计算公式:

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 为 1 个酶活单位。

$$\text{AChE 酶活(U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{上清}} \div V_{\text{酶促}}) \div T = 2255 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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 为 1 个酶活单位。

$$\text{AChE 酶活(U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{酶促}}) \div T = 2255 \times \Delta A \div W$$

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 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AChE 酶活(U/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{酶促}}) \div T \\ &= 2255 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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 为 1 个酶活单位。

$$\text{AChE 酶活(U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{酶促}}) \div T = 2255 \times \Delta A$$

ϵ : TNB 摩尔消光系数, 13.6×10³L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 显色: 显色反应体系总体积, 0.2mL=2×10⁻⁴L; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=1×10⁹nmol; V 酶促: 酶促反应总体积, 0.115mL; V 上清: 吸取上清液体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr}: 蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V 样: 加入样本体积, 0.015mL; T: 反应时间, 5min; 细胞数量: 提取时的细胞数量, 万个。

B、用 96 孔板测定的计算公式:

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm 进行计算即可。

注意事项:

1. 测定过程中样本和工作液在冰上放置，以免变性和失活。
2. 当吸光值大于 1 时，建议将样本稀释后测定。

相关发表文献:

[1] Wensu Han, Yemeng Yang, Jinglin Gao, et al. Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or combined. *Ecotoxicology*. May 2019; 28(4):399-411. (IF2.46)

[2] Hao Song, Liping Huang, Yuping Li, et al. Neuroprotective effects of cordycepin inhibit A β -induced apoptosis in hippocampal neurons. *NeuroToxicology*. September 2018; (IF3.263)

[3] Xiao Hui Xu, Yinghui Guo, Hongwei Sun, et al. Effects of Phytase Transgenic Maize on the Physiological and Biochemical Responses and the Gut Microflora Functional Diversity of *Ostrinia furnacalis*. *Scientific Reports*. March 2018; (IF4.011)

相关系列产品:

BC0840/BC0845 羧酸酯酶 (CarE) 活性检测试剂盒

BC2130/BC2135 组织及血液酸性磷酸酶 (ACP) 活性检测试剂盒

BC2140/BC2145 组织及血液碱性磷酸酶 (AKP/ALP) 活性检测试剂盒

