

使用说明书

Instruction Manual

乙酰胆碱酯酶(AchE)活性检测试剂盒（微量法）

Acetylcholinesterase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。AchE 催化乙酰胆碱(Ach)水解，在神经传导调节中起重要作用。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0008M-ES	液体 100mL×1 瓶	4℃保存。
CB0008M-A	液体 20mL×1 瓶	4℃保存。临用前置于 37℃水浴中预热 30min。
CB0008M-B	粉剂×1 支	4℃保存。临用前加入 1.3mL CB0008M-A，充分震荡溶解。
CB0008M-C	粉剂×1 支	4℃保存。临用前加入 1.3mL CB0008M-A，充分震荡溶解。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

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

二、粗酶液提取：

- 细菌、真菌或培养细胞：按照细胞数量 (10^4 个)：CB0008M-ES 体积 (mL) 为 500-1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL CB0008M-ES)，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。
- 组织：按照组织质量(g)：CB0008M-ES 体积(mL)为 1：5-10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0008M-ES)，进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。
- 血清等液体：直接测定。

三、测定步骤：

- 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
- CB0008M-A 置于 37℃水浴中预热 30min。
- 取微量玻璃比色皿/96 孔板，依次按下表加入：

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	20	
CB0008M-A	160	
CB0008M-B	10	
CB0008M-C	10	
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		20
CB0008M-A		160
CB0008M-B		10
CB0008M-C		10
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: 空白管只需测定 1-2 次。

四、乙酰胆碱酯酶活性计算:

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。

AchE 酶活(U/mg prot)=[(ΔA 测定管- ΔA 空白管) $\div \epsilon \div d \times V$ 反总 $\times 10^9$] $\div (Cpr \times V$ 样) $\div T = 245 \times (\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管) $\div Cpr$

(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(U/g)=[(ΔA 测定管- ΔA 空白) $\div \epsilon \div d \times V$ 反总 $\times 10^9$] $\div (W \times V$ 样 $\div V$ 样总) $\div T = 245 \times (\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管) $\div W$

2. 细菌、真菌或培养细胞 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(U/ 10^4 cell)=[(ΔA 测定管- ΔA 空白) $\div \epsilon \div d \times V$ 反总 $\times 10^9$] $\div (细胞数量 \times V$ 样 $\div V$ 样总) $\div T = 245 \times (\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管) $\div 细胞数量$

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(U/mL)=[(ΔA 测定管- ΔA 空白管) $\div \epsilon \div d \times V$ 反总 $\times 10^9$] $\div V$ 样 $\div T = 245 \times (\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管) $\div Cpr$

注: ϵ : TNB 摩尔消光系数, 13.6×10^3 L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L; V 样总: 提取液体积, 1 mL; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; 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。

AchE 酶活(U/mg prot)=[(ΔA 测定管- ΔA 空白管) $\div \epsilon \div d \times V$ 反总 $\times 10^9$] $\div (Cpr \times V$ 样) $\div T = 490 \times (\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管) $\div Cpr$

(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(U/g) = $[(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 490 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$

2. 细菌、真菌或培养细胞 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(U/ 10^4 cell) = $[(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 490 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$

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(U/mL) = $[(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 490 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr}$

注： ϵ ：TNB 摩尔消光系数， 13.6×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm； $V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积 (L)， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1 mL； 10^6 ：1mol = $1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ；Cpr：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。

注意事项

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

