

# 乙酰胆碱酯酶（AChE）活性测定试剂盒说明书

（分光法 48 样）

## 一、产品简介：

乙酰胆碱酯酶（AChE，EC.3.1.1.7）是生物体内保证神经信号正常传递的关键酶，在神经传导调节中起重要作用。

乙酰胆碱酯酶催化乙酰胆碱（AChE）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 吸光度增加速率即可得出 AChE 酶活性大小。

## 二、试剂盒组成和配置：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 35mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 3mL 乙醇，充分溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×2 支	4°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部，每支再加 1.2mL 蒸馏水，充分震荡溶解。

## 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪。

## 四、乙酰胆碱酯酶（AChE）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

### 1、样本制备：

#### ① 组织样本：

称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

**【注】：**若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

#### ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

**【注】：**若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

#### ③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

### 2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30 min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂可于 37°C 水浴中孵育 20min 以上。在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本	60
试剂一	640
试剂二	40
试剂三	40

混匀，37°C 条件下反应，30s 时于 412nm 处读取吸光值 A1，5min30s 读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

---

---

【注】1.加完试剂三反应即启动;若 A1 值大于 1 或 $\Delta A$  大于 1,可减少样本体积 V1 (如由 60 $\mu$ L 减至 20 $\mu$ L,则试剂一相应增加),或减少反应时间 T (如由 5min30s 减至 2min30s 读 A2),则改变后的 V1 和 T 重新代入公式计算。

2.若 $\Delta A$  低于 0.01,可增加样本取样量 W (如 0.2g),或加大样本体积 V1 (如由 60 $\mu$ L 增至 120 $\mu$ L,则试剂一相应减少),或延长反应时间 T (如由 5min30s 增至 15min30s 或更长读 A2),则改变后的 W 和 V1 和 T 重新代入公式计算。

## 五、结果计算:

### 1. 按照蛋白浓度计算:

酶活定义: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(nmol/min/mg prot)=( $\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9$ ) $\div$ (Cpr $\times$ V1) $\div$ T=191.2 $\times$  $\Delta A \div$ Cpr

### 2. 按照样本质量计算:

酶活定义: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(nmol/min/g 鲜重)=( $\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9$ ) $\div$ (W $\times$ V1 $\div$ V) $\div$ T=191.2 $\times$  $\Delta A \div$ W

### 3. 细菌、细胞 AchE 活性:

酶活定义:每 10<sup>4</sup> 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(nmol/min/10<sup>4</sup> cell)=( $\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9$ ) $\div$ (500 $\times$ V1 $\div$ V) $\div$ T=0.38 $\times$  $\Delta A$

### 4. 液体中 AchE 活性:

酶活定义: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(nmol/min /mL)=( $\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9$ ) $\div$ V1 $\div$ T=191.2 $\times$  $\Delta A$

$\epsilon$ ---TNB 摩尔消光系数, 13.6 $\times$ 10<sup>3</sup> L/mol/cm;

d---光径, 1cm;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---加入上清液体积, 0.06 mL;

V2---反应体系总体积, 780 $\mu$ L=7.8 $\times$ 10<sup>-4</sup>L;

T---反应时间, 5min;

W---样本取样质量, g;

500---细菌或细胞数量, 万;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL); 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。