

## 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 ( $10^4$  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℃，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 20 $\mu$ L 上清液、160  $\mu$ L 试剂二、10 $\mu$ L 试剂三和 10 $\mu$ L 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。 $\Delta A$  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 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。

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

**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。

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

$\varepsilon$ ：TNB 摩尔消光系数，13.6×10<sup>3</sup> 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<sup>-4</sup>L；V 样总：提取液体积，1 mL；10<sup>6</sup>：1mol=1×10<sup>6</sup>μmol；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 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。

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

**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。

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

$\varepsilon$ ：TNB 摩尔消光系数，13.6×10<sup>3</sup> L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；V 反总：反应体系总体积 (L)，200μL=2×10<sup>-4</sup>L；V 样总：提取液体积，1 mL；10<sup>6</sup>：1mol=1×10<sup>6</sup>μmol；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。