

乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AchE) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 2.6mL 试剂一，充分震荡溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 2.6mL 试剂一，充分震荡溶解。

粗酶液提取：

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、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 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。

测定操作：

1. 分光光度计预热 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 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100 μ L 上清液、800 μ L 试剂一、50 μ L 试剂二和 50 μ L 试剂三，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 的酶量为 1 个酶活单位。

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

$$= 245 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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(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。

AchE 酶活(nmol/min/ 10^4 cell)=($\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9$) \div (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。

AchE 酶活(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, 13.6×10^3 L/mol/cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), 1 mL=0.001 L; 10^6 : 1mol= 1×10^6 μ mol; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 蛋白浓度 (mg/mL); W: 样本质量, g; $V_{\text{样}}$: 加入上清液体积 (mL), 0.1 mL; T: 反应时间 (min), 3 min。