

## 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：

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。

细菌、真菌：按照细胞数量（10<sup>4</sup>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。

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20μL上清液、160 μL试剂二、10μL试剂三和10μL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。△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

**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。

$$\text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 245 \times \Delta A \div Cpr$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 245 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

### 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的酶量为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/104 \text{ cell}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 245 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

### 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。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min} / \text{mL}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 245 \times \Delta A \end{aligned}$$

$\epsilon$ : TNB摩尔消光系数,  $13.6 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1 \text{ cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积 (L),  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 提取液体积,  $1 \text{ mL}$ ;  $106$ :  $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ;  $Cpr$ : 蛋白浓度 (mg/mL);  $V_{\text{样}}$ : 加入上清液体积 (mL),  $0.02 \text{ mL}$ ;  $W$ : 样品质量;  $T$ : 反应时间 (min),  $3 \text{ min}$ 。

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。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 490 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 490 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

#### 2. 细菌、细胞AChE活性

活性单位定义：每104个细胞每分钟催化产生1nmol TNB的酶量为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min}/104 \text{ cell}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 490 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

#### 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。

$$\text{AChE酶活}(\text{nmol}/\text{min} / \text{mL}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div V_{\text{样}} \div T$$

$$=490 \times \Delta A$$

$\epsilon$ : TNB摩尔消光系数,  $13.6 \times 10^3$  L/mol/cm;  $d$ : 96孔板光径, 0.5 cm;  $V_{\text{反总}}$ : 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;  $106$ :  $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 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.

---

[www.affandi-e.com](http://www.affandi-e.com)