

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 检测试剂盒 (分光光度法)

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。

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：

- 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。
- 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。
- 血清等液体：**直接测定。

测定步骤：

- 分光光度计预热 30 min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
- 试剂二置于 37℃ 水浴中预热 30min。
- 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。

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

(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。

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

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。

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

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。

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

ϵ : TNB 摩尔消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $1 \text{ mL} = 0.001 \text{ L}$;

10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$;

$V_{\text{样总}}$: 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。