

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1446

产品规格: 100管/48样

产品简介:

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。

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412nm吸光度增加速率,计算AChE活性。



注意:实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

试验中所需的仪器和试剂:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、蒸馏水。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体30mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×2瓶	2-8℃
试剂三	液体3mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体6mL×1瓶	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂二:临用前取1瓶加入2.6 mL试剂一充分震荡溶解,用不完的2-8℃保存一周;

操作步骤 (仅供参考):

一、样本处理 (可适当调整待测样本量,具体比例可以参考文献)

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、细胞:按照细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为500~1000:1的比例(建议500万细胞加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。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上,调节波长至412nm,蒸馏水调零。
2. 样本测定:



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话:400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ:807961520 731791866

邮箱:zzlybio@126.com

试剂 (μL)	测定管	对照管
样本	15	15
试剂二	50	-
37°C 水浴准确反应 5min。		
试剂四	50	50
试剂二	-	50
混匀后 12000rpm 常温离心 5min。分别吸取 10 μL 上清液于新的 EP 管或 96 孔板中，之后分别加入。		
试剂一	170	170
试剂三	20	20
混匀，放置 2min 后于微量玻璃比色皿中或 96 孔板中测定 412nm 处的吸光度，记为 A 测定管，A 对照管，计算 $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}$ 。		

二、AChE 酶活计算公式

A、用微量玻璃比色皿测定计算公式：

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 为 1 个酶活单位。

$$\text{AChE 酶活(U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 显色} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样} \times V \text{ 上清} \div V \text{ 酶促}) \div T = 2255 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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 为 1 个酶活单位。

$$\text{AChE 酶活(U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 显色} \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times V \text{ 上清} \div V \text{ 酶促}) \div T = 2255 \times \Delta A \div W$$

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 为 1 个酶活单位。

$$\text{AChE 酶活(U/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 显色} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times V \text{ 上清} \div V \text{ 酶促}) \div T \\ = 2255 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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 为 1 个酶活单位。

$$\text{AChE 酶活(U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 显色} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times V \text{ 上清} \div V \text{ 酶促}) \div T = 2255 \times \Delta A$$

ϵ : TNB 摩尔消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; $V \text{ 显色}$: 显色反应体系总体积, $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$;
 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 1 \times 10^9\text{nmol}$; $V \text{ 酶促}$: 酶促反应总体积, 0.115mL ; $V \text{ 上清}$: 吸取上清液体积, 0.01mL ;
 $V \text{ 样总}$: 加入提取液体积, 1mL ; Cpr : 蛋白浓度, mg/mL ; W : 样本质量, g ; $V \text{ 样}$: 加入样本体积, 0.015mL ;
 T : 反应时间, 5min ; 细胞数量: 提取时的细胞数量, 万个。

B、用 96 孔板测定的计算公式：

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ 进行计算即可。

注意事项：

1. 测定过程中样本和工作液在冰上放置，以免变性和失活。
2. 当吸光值大于 1 时，建议将样本稀释后测定。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com