

乙酰胆碱酯酶(AChE)测定试剂盒说明书

(货号: A024-2-1 微板法 96T)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

乙酰胆碱酯酶 (Acetyl choline esterase) 水解乙酰胆碱生成胆碱及乙酸,胆碱可以与巯基显色剂反应生成 TNB(对称三硝基苯, Sym-Trinitrobenzene) 黄色化合物,根据颜色深浅进行比色定量,水解产物胆碱的数量可反应胆碱酯酶的活力。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

- 试剂一:** 标准品粉剂×1 支, 4℃ 保存。临用时取标准品一支加 1mL 生理盐水溶解配成 **10μmol/mL 标准液**, 4℃ 保存; 再取 **10μmol/mL 标准液** 10μL, 加生理盐水 90μL 配成 **1μmol/mL 标准液**, 现配现用。
- 试剂二:** 底物, 粉剂×2 支, 4℃ 保存。用时每支粉剂加生理盐水 20mL 溶解, 制备成**底物缓冲液**, 4℃ 可保存两周 (-20℃ 可保存 1 个月, 避免反复冻融)。
- 试剂三:** 显色剂贮备液, 2mL×1 支, 4℃ 保存。用时按照显色剂贮备液: 生理盐水=1:9 的比例稀释, 配成**显色应用液**, 按需配制, 也可一次性配制 20mL, 配好后 4℃ 避光可保存 3 个月。
- 试剂四:** 抑制剂, 液体 1.5mL×1 支, 4℃ 保存。
- 试剂五:** 澄清剂, 液体 4mL×1 支, 室温保存。天冷时会有沉淀或混浊, 须在 37℃ 加热至透明后方可使用。
- 生理盐水:** 60mL×1 瓶, 室温保存。

三、所需仪器及试剂:

酶标仪 (412±10nm) 及 96 孔板(附送一块), 蒸馏水, 37℃ 水浴锅 (或恒温箱), 蛋白测定试剂 (组织或细胞样本用, 本公司有售)。

四、操作过程:

1、样品前处理:

- 血清 (浆):** 取不抗凝或抗凝全血 1000~1500 转/分, 离心 8 分钟, 取上层血清 (浆) 待测。一般测定时将血清或血浆用生理盐水 1:9 稀释 (具体稀释浓度以预实验结果为准)。
- 组织样本:** 准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (mL) =1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测 (同时取部分上清测定蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)。
- 细胞样本:** 收集细胞 (贴壁细胞用胰酶消化或细胞刮刮下, 转移到离心管中 1000-2000 转/分, 离心 5 分钟, 弃去上清留沉淀, 悬浮细胞直接转移后离心收集沉淀), 往沉淀中加 0.5-1mL 的 PBS 清洗 1~2 次, 1000-2000 转/分, 离心收集沉淀细胞, 再加入 0.3~0.5mL 0.01M PH 7.4 的等渗 PBS 缓冲液悬浮细胞 (此时可取少量细胞悬液进行细胞计数, 若是考虑破碎后测蛋白, 则可不计数), 超声 (功率 200~300W, 运行 5-10 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5min) 或手动研磨破碎细胞, 取破碎后的细胞悬液待测 (若悬液有明显颗粒物或絮状物, 可 2000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清使用, 同时取部分上清测定蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)。
- 全血样本:** 取 0.1mL 抗凝全血加蒸馏水至 5mL 制备成溶血液 (即按 1:49 稀释), 充分混匀。若样本量较少, 可以按比例缩减, 例如取 0.01mL 或 0.02mL 抗凝全血加蒸馏水至

0.5mL 或 1mL, 充分混匀后待测 (用之前最好也先混匀)。

注: 上述制备好的样本 (或上清) 在测试前需挑选 2 例, 分别稀释一定的倍数 (如 2 倍、5 倍、10 倍) 按操作表操作进行预试, 预试结果以测定 OD 值-对照 OD 值在 0.1~0.2 间为宜来确定正式实验样本稀释倍数。

2、操作表: (底物缓冲液和显色应用液, 以及试剂四和试剂五可按操作表比例两两预先混合, 一次性加入反应, 可减少操作时间, 但配好的混合液需尽快使用, 不可保存)

	测定孔	对照孔	标准孔	空白孔
样本 (μL)	10			
1μmol/mL 标准液 (μL)			10	
生理盐水 (μL)				10
底物缓冲液 (μL)	100	100	100	100
显色应用液 (μL)	100	100	100	100
轻轻振荡孔板混匀, 37℃ 准确反应 6 分钟				
试剂四 (μL)	6	6	6	6
试剂五 (μL)	20	20	20	20
样本 (μL)		10		
轻轻振荡孔板混匀, 室温 (18-25℃) 静置 15 分钟, 波长 412nm, 酶标仪读数。				

- [注]:** 1、对照孔与测定孔一一对应, 必须每个样本都做, 因为每个样本对照孔的吸光度差异较大。
- 2、若是测定孔 OD 值-对照孔 OD 值>0.3 时, 建议将样本稀释后再测, 若是此差值<0.02, 则需选用更高的样本浓度或是延长 37℃ 反应时间, 变量代入计算。
- 3、反应液读数前室温放置 15 分钟, 若室温温度过低, 可能会出现沉淀或混浊, 此时可将孔板置于 37℃ 保温片刻, 即可澄清, 澄清后方可读数, 且对实验结果无影响。
- 4、因反应时间短, 故批量测试时, 每批所测样本数量不可过多, 或者用排枪操作降低操作时间偏差, 否则会影响实验精确度。

五、计算:

(一)、血清 (或全血) 中乙酰胆碱酯酶的计算:

- 1、定义: 每毫升血清 (或全血) 样本在 37℃ 保温 6 分钟, 水解反应体系中 1μmol 基质为 1 个活力单位。
- 2、计算公式:

$$\text{血清 (浆) AChE 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{6}{T} \times N$$

(二)、组织 (或细胞) 中乙酰胆碱酯酶按蛋白浓度计算:

- 1、定义: 每毫克组织蛋白在 37℃ 保温 6 分钟, 水解反应体系中 1μmol 基质为 1 个活力单位。
- 2、计算公式:

$$\text{组织 (或细胞) AChE 活力 (U/mg 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \times \frac{6}{T} \div \text{Cpr}$$

(三)、组织中乙酰胆碱酯酶按组织鲜重计算:

- 1、定义: 每克组织在 37℃ 保温 6 分钟, 水解反应体系中 1μmol 基质为 1 个活力单位。
- 2、计算公式:

$$\text{组织 AChE 活力 (U/g 组织)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \times \frac{6}{T} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

(四)、细胞中乙酰胆碱酯酶按细胞数计算:

1、定义: 每 1 万个细胞在 37℃保温 6 分钟, 水解反应体系中 1μmol 基质为 1 个活力单位。

2、计算公式:

$$\text{细胞AChE活力 (U/10}^4\text{细胞)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \times \frac{6}{T} \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中:

C_{标准}:标准品浓度, 1μmol/mL;

C_{pr}:组织匀浆上清蛋白浓度,mg/mL;

N: 样本测试前稀释倍数;

W: 组织重量, g;

T: 37℃反应时间, 6min。

V_{样总}: 样本匀浆破碎时加入的匀浆介质的总体积, mL。

六、测定意义:

胆碱酯酶是胆碱能神经递质乙酰胆碱的水解酶, 直接参与植物神经功能调节、肌肉运动、大脑思维、记忆等重要功能。胆碱酯酶活力有改变时, 以上各组织器官功能也会有改变。另外, 有机磷农药是胆碱酯酶的特异性抑制物, 它通过各种途径进入机体后可抑制胆碱酯酶活性。