

乙酰胆碱酯酶(AChE)测定试剂盒说明书

(货号: A024-1-1 比色法 50 管/24 样)

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、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

- 试剂一: 标准品, 粉剂×3 支, 4℃保存。1μmol/mL 标准液
配制: 取标准品一支用 10mL 生理盐水溶解, 混匀, 现用现配。
- 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。
- 试剂三: 显色剂贮备液, 3mL×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 30mL, 配好后 4℃避光可保存 3 个月。
- 试剂四: 抑制剂, 液体 2mL×1 支, 4℃保存。
- 试剂五: 澄清剂, 液体 6mL×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×2 瓶, 室温保存。

二、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 0.5cm 光径比色皿(或酶标仪(412±10nm) 及 96 孔板), 蒸馏水, 涡旋混匀器, 37℃水浴锅(或恒温箱), 蛋白测定试剂(组织样本或细胞用, 本公司有售)。

三、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 分钟后弃上清留沉淀, 悬浮细胞直接转移后离心收集沉淀), 往沉淀中加 0.5-1mL 的等渗 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 分钟后取上清使用, 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。如果您的样本量很少, 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 0.2 左右为宜来确定正式实验样本稀释倍数。

2、操作表:

	测定管	对照管	标准管	空白管
样本 (mL)	0.05			
1μmol/mL 标准液 (mL)			0.05	
蒸馏水 (mL)				0.05
底物缓冲液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
显色应用液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
混匀, 37℃准确反应 6 分钟				
试剂四 (mL)	0.03	0.03	0.03	0.03
试剂五 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
样本 (mL)		0.05		

混匀, 室温(18-25℃)静置 15 分钟, 波长 412nm, 0.5cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测各管 OD 值 A (或是每管吸取 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 412nm 处读数)。

- [注]: 1、对照管与测定管一一对应, 必须每个样本都做, 因为每个样本对照管的吸光度差异较大。
- 2、若是测定管 OD 值-对照管 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、比色前试管室温放置 15 分钟, 若室温过低, 可能会出现沉淀或混浊, 此时, 请将各管置于 37℃保温片刻, 即可澄清, 澄清后方可比色, 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, 准确控制反应时间, 否则会影响实验精确度。

四、单位定义及计算:

(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: 每克组织中的乙酰胆碱酯酶在 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:

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

五、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。

六、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。

七、本法优点:

- 1、灵敏度高。微量样品即可测出乙酰胆碱酯酶的水平。
- 2、可以分型。本公司另有试剂盒可测丁酰胆碱酯酶。
- 3、方法简便快速,准确稳定。
- 4、无需气相色谱等高级仪器,只要一般分光光度计或酶标仪即可。