

乙酰胆碱酯酶（AChE）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHD6-C24	乙酰胆碱酯酶（AChE）活性检测试剂 盒	24T	常量法
AYHD6-C48		48T	

一、测定意义：

AChE（Acetylcholinesterase）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。

二、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 405nm 处有吸收峰，通过测定 405nm 吸光度增加速率，计算 AChE 活性。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 80mL×1 瓶	液体 80mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂二配制：用时每瓶粉剂加入试剂一 30mL，混匀充分溶解，-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。			
试剂三	液体 25mL×1 瓶	液体 50mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 10mL×1 瓶	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品 (10μmol/mL)	液体 1mL×1 支	液体 1mL×2 支	2-8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

- 1、组织：按照组织质量（g）:提取液(mL)为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 2、细菌、细胞：按照细胞数量 10⁴ 个：提取液体积（mL）500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
- 3、血清（浆）等液体：直接测定。

五、测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 将10μmol/mL标准品用蒸馏水依次稀释至0、1、2、4、6、8μmol/mL，备用；
4. 操作表：

	测定管	对照管	空白管	标准管
样品（μL）	100	100	-	-
蒸馏水（μL）	-	-	100	
标准品（μL）	-	-	-	100
试剂二（μL）	500	500	500	500
试剂三（μL）	-	400	400	400
混匀，37℃孵育 10min				
试剂三（μL）	400	-	-	-
12000r 离心 3min，取上清				
上清液（μL）	100	100	100	100
试剂一（μL）	750	750	750	750
试剂四（μL）	150	150	150	150
混匀，空白管调零,10min 内于波长 405nm 处测定各管吸光度。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$				

六、乙酰胆碱酯酶（AChE）活性计算：

1、标准曲线绘制：以吸光度值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线 $y=kx+b$ ， x 为吸光度值， y 为标准品浓度（μg/mL）。根据标准曲线，将 ΔA 带入公式计算出样本浓度（ y ，μg/mL）；

2、血清样本乙酰胆碱酯酶（AChE）计算

单位定义：每毫升血清每分钟催化产生 1μmol 巯基的量为一个活力单位。

计算公式：乙酰胆碱酯酶（AChE）（U/mL）= $y \div T$

3、组织、细胞样本 ACP 计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1μmol 巯基的量为一个活力单位。

计算公式：乙酰胆碱酯酶（AChE）（U/mg prot）= $y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每克组织催化产生 $1\mu\text{mol}$ 巯基的量为一个活力单位。

计算公式：乙酰胆碱酯酶（AchE）（U/g） $=y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

（3）按照细菌或细胞数量计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 $1\mu\text{mol}$ 巯基的量为一个活力单位。

计算公式：乙酰胆碱酯酶（AchE）（U/ 10^4 cell） $=y \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1mL；

$V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL；

T：反应时间，10min；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

500：细胞/细菌数，500 万；

七、 注意事项：

- 1、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；
- 2、测定过程中样本和工作液在冰上放置，以免变性和失活。