

乙酰胆碱酯酶(AChE)测定试剂盒说明书(精简版)

(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!

取 a mL (一般为 0.1mL) 进行检测, 每个样本取样前必须充分混匀。

一、试剂组成及配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 标准品, 粉剂×3 支, 4℃ 保存。**1μmol/mL 标准品应用液配制:** 取标准品一支加生理盐水 10mL 混匀, 现用现配。

试剂二: 底物, 粉剂×2 支, 4℃ 保存。**底物缓冲液配制:** 用时每支粉剂加生理盐水 20mL, 制备成底物缓冲液, 4℃ 保存两周。

试剂三: 显色剂贮备液, 3mL×1 支, 4℃ 保存。**显色应用液配制:** 用时按照显色剂贮备液: 生理盐水=1:9 稀释, 配成显色应用液。按需配制, 也可一次配制 30mL, 避光冷藏 3 个月。

试剂四: 抑制剂, 液体 2mL×1 支。打开后可转移到离心管内, 室温保存。

试剂五: 透明剂, 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、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。

三、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。

四、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。另有配套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即可。
- 5、本法适用于分光光度计或酶标仪 (酶标仪读数时各管取 200μL 反应液加到 96 孔板中 412±10nm 处读数) 测定。

五、所需仪器耗材及试剂:

含 412nm 波长的分光光度计及 0.5cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、37℃ 水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

六、操作过程:

1、样品前处理:

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, 2500 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, 蛋白定量试剂盒本所有售)。

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)。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)。

全血样本: 取 0.1mL 抗凝全血加双蒸水至 10mL, 即按 1:99 稀释, 充分混匀。如果您的样本量很少, 可以减少取样量。例如取 0.01mL 或 0.02mL 抗凝全血加双蒸水至 1mL 或 2mL。

2、操作步骤:

	测定管	对照管	标准管	空白管
样本 (mL)	a *			
1μmol/mL 标准品应用液 (mL)			a *	
双蒸水 (mL)				a *
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				
抑制剂 (mL)	0.03	0.03	0.03	0.03
透明剂 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
样本 (mL)		a *		
混匀, 室温静置 15 分钟, 波长 412nm, 0.5cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度 OD 值				

- [注]:** 1、对照管必须每个样本都做, 因为每个样本对照管的吸光度差异较大。
- 2、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, 请将试管置于 37℃ 水浴中片刻, 即可澄清, 澄清后方可比色, 且对实验结果无影响。
- 3、因反应时间较短, 故批量测试时, 每批所测样本不可过多, 准确控制反应时间, 否则会影响实验精确度。
- 4、a* 所表示所取的样品量、标准品量、双蒸水的量, 三者均相等:

- ①、血清 (浆) 测试前用生理盐水 10 倍稀释, 参考取样量为 30~50μL。
- ②、10% 脑组织匀浆的参考取样量为 30~50μL。
- ③、1:99 稀释后的全血稀释液取 0.1mL, 取样前每只只要摇匀。

七、计算:

(一)、组织匀浆中乙酰胆碱酯酶的计算:

- 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:

$$\text{组织 AChE 活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{Cpr}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 1μmol/mL;

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

(二)、血清中乙酰胆碱酯酶的计算:

- 1、定义: 每毫升血清样本在 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:

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

C_{标准}: 标准品浓度, 1μmol/mL;

N: 样本测试前稀释倍数。

(三)、全血中乙酰胆碱酯酶的计算:

- 1、定义: 每毫升全血在 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:

$$\text{全血中 AChE 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

C_{标准}: 标准品浓度, 1μmol/mL;

N: 样本测试前稀释倍数。