

乙酰胆碱酯酶(AChE)测定试剂盒

(货号: BC096 比色法 50 管/24 样)

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℃可保存两周。

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, 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: 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、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 (组织样本用, 本公司有售)。

三、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 抗凝全血加蒸馏水至 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 抗凝全血加蒸馏水至 1mL 或 2mL。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。

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 *	
蒸馏水 (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				
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)		a *		
混匀, 室温 (18-25°C) 静置 15 分钟, 波长 412nm, 0.5cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值 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, 请将各管置于 37°C 保温片刻, 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、蒸馏水的量,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 10 ~ 50μL。
 - ③、1:99 稀释后的全血稀释液取 0.1mL, 取样前每只要摇匀。

四、计算公式及举例:

(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°C 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)。

3、计算举例:

例 1: 取 10%大鼠脑组织匀浆 0.03mL 测乙酰胆碱酯酶的活力, 测得测定管 OD 为 0.283, 对照管 OD 为 0.080, 标准管 OD 为 0.192, 空白管 OD 为 0.034, 标准管浓度为 1μmol/mL, 10%大鼠脑组织匀浆蛋白浓度为 3.84mgprot/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{组织ACHE活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.283 - 0.080}{0.192 - 0.034} \times 1 \div 3.84 \\ &= 0.3346\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

例 2: 取 10%日本对虾肌肉匀浆 0.03mL 测乙酰胆碱酯酶的活力, 测得测定管 OD 为 0.193, 对照管 OD 为 0.054, 标准管 OD 为 0.195, 空白管 OD 为 0.040, 标准管浓度为 1μmol/mL, 10%日本对虾肌肉组织匀浆蛋白浓度为 6.2638mgprot/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{组织ACHE活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.193 - 0.054}{0.195 - 0.040} \times 1 \div 6.2638 \\ &= 0.1432\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

例 3: 取 10%中华鲟脑组织匀浆 0.03mL 测乙酰胆碱酯酶的活力, 测得测定管 OD 为 0.308, 对照管 OD 为 0.076, 标准管 OD 为 0.204, 空白管 OD 为 0.048, 标准管浓度为 1μmol/mL, 10%中华鲟脑组织匀浆蛋白浓度为 4.0698mgprot/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{组织ACHE活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.308 - 0.076}{0.204 - 0.048} \times 1 \div 4.0698 \\ &= 0.3654\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

(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°C 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:

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

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, 1 $\mu\text{mol/mL}$;

N : 样本测试前稀释倍数。

3、计算举例:

取 10 倍稀释后的血清 0.03mL 测乙酰胆碱酯酶的活力, 测得测定管 OD 为 0.498, 对照管 OD 为 0.086, 标准管 OD 为 0.190, 空白管为 0.032, 标准管浓度为 1 $\mu\text{mol/mL}$ 。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{血清(浆)ACHE活力 (U/mL)} &= \frac{0.498 - 0.086}{0.190 - 0.032} \times 1 \times 10 \\ &= 26.08\text{U/mL} \end{aligned}$$

(三)、全血中乙酰胆碱酯酶的计算:

1、定义: 每毫升全血在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 6 分钟, 水解反应体系中 1 μmol 基质为 1 个活力单位。

2、计算公式:

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

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, 1 $\mu\text{mol/mL}$;

N : 样本测试前稀释倍数。

3、计算举例:

取 1 : 99 倍稀释后的全血稀释液 0.1mL 测乙酰胆碱酯酶的活力, 测得测定管 OD 为 0.492, 对照管 OD 为 0.212, 标准管 OD 为 0.364, 空白管为 0.040, 标准管浓度为 1 $\mu\text{mol/mL}$ 。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{全血中ACHE活力 (U/mL)} &= \frac{0.492 - 0.212}{0.364 - 0.040} \times 1 \times 100 \\ &= 86.42\text{U/mL} \end{aligned}$$

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。