

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 试剂盒

微板法

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使 用 说 明 书

货号: JL-T1293

有效期: 6个月

规格: 48T(48S)/96T(96S)

保存温度: 2-8°C

实验原理：

乙酰胆碱酯酶(AchE)催化乙酰胆碱(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 412 nm 处有特征吸收峰，通过测定 412 nm 处吸光度增加速率，计算 AchE 的活性。本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：JL-T0336)。

检测范围： 1.43-572U/mL **灵敏度：** 1.43U/mL

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

产品组成:

| 试剂名称 | 规格 (48T/23S) | 规格 (96T/47S) | 保存条件 |
|------|--------------|--------------|----------|
| 提取液 | 50mL×1 瓶 | 100mL×1 瓶 | 2-8℃, 避光 |
| 试剂一 | 5mL×1 瓶 | 10mL×1 瓶 | 2-8℃ |
| 试剂二 | 8.5mL×1 瓶 | 17mL×2 瓶 | 2-8℃, 避光 |
| 试剂三 | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×1 瓶 | 2-8℃, 避光 |

所需仪器耗材及试剂:

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.43-572U/mL，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本的稀释液为蒸馏水。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**：按照样本质量(g)：体积(mL)为 1: 5~10 的比例加入匀浆介质(建议取 0.1g 组织样本,加入 1mL 提取液)进行冰浴匀浆。4°C, 10000 g 离心 10min, 取上清待测。
4. **细菌或细胞样本**：按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液)，冰浴超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min)；10000 g, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
5. **血清 (浆) 等液体样本**：直接测定。若浑浊，离心后取上清测定。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **试剂一**：临用前置于 37°C水浴中预热 30min。
3. **试剂三配制**：临用前取一瓶试剂三加入预热好的 1.3mL 试剂一，充分震荡溶解。2-8°C避光可保存 7 天。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm。
2. 样本测定 (在 96 孔板中依次加入) :

| 试剂名称(μL) | 测定孔 |
|----------|-----|
| 样本 | 20 |
| 试剂二 | 170 |
| 试剂三 | 10 |

充分混匀, 酶标仪振板 5s, 于波长 412nm 处, 测定第 30s 时的 OD 值记为 A_1 , 第 330s 时的 OD 值记为 A_2 , $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注: 加入样本时控制一定不能产生气泡, 否则容易影响结果。

实验结果结算:

1. 血清血浆等液体样本 AchE 活性:

定义: 在 37°C 条件下, 每毫升液体样本每分钟催化产生 1nmolTNB 的酶量为 1 个活性单位。

$$\text{AchE 酶活(U/mL)} = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T \times N = 286 \times \Delta A \times N$$

2. 组织和细胞 AchE 活性(按蛋白浓度计算):

定义: 在 37°C 条件下, 每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmolTNB 的酶量为 1 个活性单位。

$$\text{AchE 酶活(U/mgprot)} = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times N = 286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times N$$

3. 组织 AchE 活性(按组织重量计算):

定义: 在 37°C 条件下, 每克组织每分钟催化产生 1nmolTNB 的酶量为 1 个活

性单位。

$$\text{AChE 酶活(U/g 鲜重)} = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times N = 286 \times \Delta A \div W \times N$$

注:

ΔA : 测定孔在两个时间点内的 OD 值的变化($\Delta A = A_2 - A_1$) ε : TNB 的摩尔吸光系数, 1.36×10^4 L/mol/cm

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液的体积, 1mL $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.2mL

$V_{\text{样}}$: 加入上清液体积, 0.02mL T: 反应时间, 5min

W: 样本鲜重, g N: 样本的稀释倍数

10^9 : 单位换算 $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$

d: 比色光径=体积÷底面积, 标准 96 孔平底板底面积 0.32cm^2 中加入 0.225mL 液体时光径为 0.7031cm, 约为 0.7cm

参考样本数据：

以下数据仅供参考：

| 样本类型 | 稀释倍数 | 参考值 |
|---------------|------|----------------|
| 大鼠脑组织 (10%匀浆) | 不稀释 | 2.224U/mg prot |
| 人血清 | 不稀释 | 36.036U/mL |

咨询电话：400-0066-400

传 真：021-55660885

电子邮箱：shjls@163.com

网 址：www.jonln.com