

乙酰胆碱酯酶(AchE)试剂盒 微板法

使用说明书

产品货号: BP10196W

注意: 请在试剂盒保质期内使用, 具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用, 不能用于临床诊断。

检测范围: 1.43-572U/mL

灵敏度: 1.43U/mL

有效期: 6个月

保存温度: 2-8℃

检测原理:

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。

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。

试剂盒组分：

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×1 瓶	2-8℃，避光
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 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℃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℃ 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℃ 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(μ L)	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℃ 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。

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

2. 组织和细胞 AchE 活性(按蛋白浓度计算)：

定义：在 37℃ 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。

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

3. 组织 AchE 活性(按组织重量计算)：

定义：在 37℃ 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

Note: