

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K174-M

产品规格: 48T(48 samples)/96T(96 samples)

检测仪器: 酶标仪(412 nm)

## **Elabscience®乙酰胆碱酯酶 (AChE) 比色法测试盒**

### **Acetylcholinesterase (AChE) Activity Assay Kit**

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、动物组织和细胞样本中的乙酰胆碱酯酶活性。

## 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。

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:E-BC-K318-M)。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	裂解液 (Lysis Buffer)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2-8℃避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明:试剂严格按上表中的保存条件保存,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。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪（检测波长 412 nm）

**试剂：**双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M, pH 7.4）

## 试剂准备

① 试剂二37°C孵育30 min；

② 试剂三、四需平衡至室温后再使用；

③ 试剂三工作液的配制：

规格1，48T：向试剂三中，加入11 mL的试剂二，溶解混匀即可，2-8°C避光可保存7天。

规格2，96T：向试剂三中，加入22 mL的试剂二，溶解混匀即可，2-8°C避光可保存7天；

④ 试剂四工作液的配制：

规格1，48T：向试剂四中，加入0.7 mL的试剂二，溶解混匀即可，2-8°C避光可保存7天。

规格2，96T：向试剂四中，加入1.3 mL的试剂二，溶解混匀即可，2-8°C避光可保存7天。

## 样本准备

### ① 样本处理

血清血浆样本：可直接测定。

组织样本：按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL)=1：9 匀浆，离心后取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取 $1 \times 10^6$ 个细胞加入200  $\mu$ L试剂一进行匀浆，4 $^{\circ}$ C，10000  $\times$  g 离心10 min，取上清置于冰上待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.225-490 U/mL，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
小鼠血清	8-20	小鼠血浆	4-10
人血清	4-10	人胸水	不稀释
大鼠血清	4-10	10%小鼠肝组织	不稀释
狗血清	4-10	10%小鼠肾组织	不稀释
人血浆	4-10	10%小鼠脑组织	2-8
马血清	2-8	10%鲫鱼肉组织	不稀释

注：稀释液为 PBS (0.01 M, pH 7.4) 或生理盐水（在预实验过程中，当第 330 s 测得的 OD 值  $A_2 > 2.5$  时，样本需进一步稀释）。

## 实验关键点

- ① 加样时需准确操作，室温反应 5 min 需严格控制，且在 10 min 内完成测定。
- ② 取用过程中避免试剂三和试剂四的交叉污染。

## 操作步骤

- ① 测定孔中加入 20  $\mu\text{L}$  的待测样本上清液。
- ② 向步骤①各孔中加入 170  $\mu\text{L}$  试剂三工作液。
- ③ 向步骤②各孔中加入 10  $\mu\text{L}$  试剂四工作液。
- ④ 酶标仪振板 5 s, 于波长 412 nm 处, 测定第 30 s 时的 OD 值记为  $A_1$ , 测定第 330 s 时的 OD 值记为  $A_2$ ,  $\Delta A_{\text{测定孔}}=A_2-A_1$ 。

## 操作表

	测定孔
上清液( $\mu\text{L}$ )	20
试剂三工作液( $\mu\text{L}$ )	170
试剂四工作液( $\mu\text{L}$ )	10
酶标仪振板 5 s, 于波长 412 nm 处, 测定第 30 s 时的 OD 值记为 $A_1$ , 第 330 s 时的 OD 值记为 $A_2$ , $\Delta A_{\text{测定孔}}=A_2-A_1$ 。	

本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用 BCA 法 (货号: E-BC-K318-M)。

## 结果计算

**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 1 nmol TNB 的酶量为 1 个活性单位。

$$\begin{aligned}\text{AchE 酶活(U/mL)} &= (\Delta A_{\text{测定孔}} \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T \times f \\ &= 245 \times \Delta A_{\text{测定孔}} \times f\end{aligned}$$

### 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 1 nmol TNB 的酶量为 1 个活性单位。

$$\begin{aligned}\text{AchE 酶活(U/mgprot)} &= (\Delta A_{\text{测定孔}} \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times f \\ &= 245 \times \Delta A_{\text{测定孔}} \div C_{\text{pr}} \times f\end{aligned}$$

### 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 1 nmol TNB 的酶量为 1 个活性单位。

$$\begin{aligned}\text{AchE 酶活(U/g 鲜重)} &= (\Delta A_{\text{测定孔}} \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times f \\ &= 245 \times \Delta A_{\text{测定孔}} \div W \times f\end{aligned}$$

### 注解:

$\Delta A_{\text{测定孔}}$ : 在 412 nm 处测定孔在两个时间点内的 OD 值的变化( $\Delta A_{\text{测定孔}} = A_2 - A_1$ )

$\varepsilon$ : TNB 的摩尔吸光系数,  $1.36 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$

$d$ : 比色光径 (0.6 cm)

$V_{\text{反应}}$ : 反应体系总体积,  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$

$V_{\text{样总}}$ : 提取液体积, 1 mL

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

$C_{\text{pr}}$ : 蛋白浓度(mg/mL)

$V_{\text{样}}$ : 加入上清液体积,  $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$

$W$ : 样品质量

$T$ : 反应时间, 5 min

$f$ : 样本加入检测体系前的稀释倍数

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

检测范围	1.225-490 U/mL	平均批间差	9.3 %
灵敏度	1.225 U/mL	平均批内差	4.7 %
平均回收率	104 %		

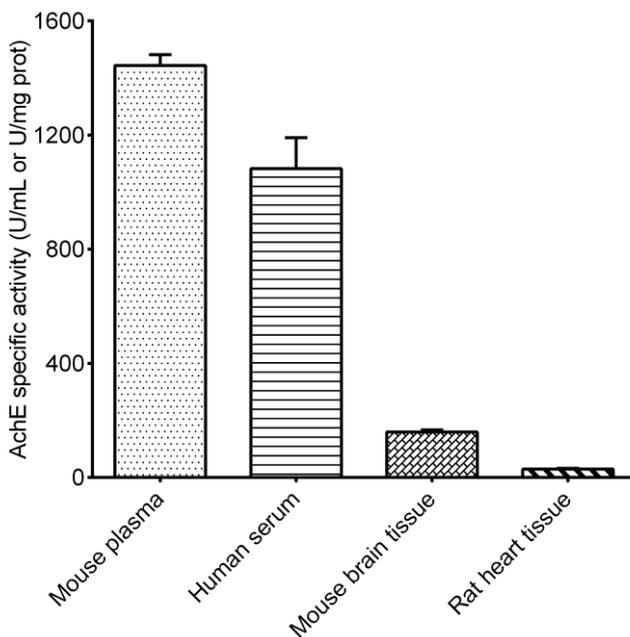
## 附录2 实例分析

例如检测大鼠血清(数据仅供参考):

将血清: PBS (0.01 M, pH 7.4) =1:4稀释, 取20  $\mu\text{L}$  稀释后的大鼠血清, 按操作表检测, 结果如下: 第30 s吸光值 $A_1$ 为0.297, 第330 s吸光值 $A_2$ 为0.405, 则 $\Delta A_{\text{测定孔}}=A_2 - A_1=0.108$ , 计算结果为:

$$\text{AchE 酶活(U/mL)} = 245 \times 0.108 \times 5 = 132.3 \text{ U/mL}$$

按照说明书操作, 测定小鼠血浆(稀释倍数5, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、人血清(稀释倍数10, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、小鼠脑组织(10%组织匀浆的蛋白浓度6.879 mg/mL, 稀释倍数3, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、大鼠心组织(10%组织匀浆的蛋白浓度3.410 mg/mL, 加样量20  $\mu\text{L}$ ) 中AchE酶活(如下图):



### 附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值不稳定，复孔差异大	加样时间过长	尽可能的缩短加样时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果>490 U/mL	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测

#### 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。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。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

## 附录4 客户发表文献

1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatform induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675
11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on

- monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
  13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
  14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1  $\alpha$  -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
  15. Chagas TQ, Freitas N, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
  16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
  17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming.[J]. *Free radical biology & medicine*, 2021. IF:6.525
  18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 9(2):161. IF:6.313
  19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3):442. IF:6.312
  20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494-. IF:6.233
  21. Obaid QA, Al-Shammari AM, Khudair KK. Glucose Deprivation Induced by Acarbose and Oncolytic Newcastle Disease Virus Promote Metabolic Oxidative Stress and Cell Death in

- a Breast Cancer Model. *Front Mol Biosci.* 2022;9:816510. IF:6.113
22. Abdel-Wahab BA, Walbi IA, Albarqi HA, Ali FEM, Hassanein EHM. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF- $\kappa$ B-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling[J]. *Food Chem Toxicol.* 2021 May;151:112133. IF:6.023
  23. Aljutaily T. Evaluating the Nutritional and Immune Potentiating Characteristics of Unfermented and Fermented Turmeric Camel Milk in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Rats. *Antioxidants (Basel).* 2022;11 (4):. IF:5.952
  24. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15):3649-. IF:5.923
  25. Shanmugarajan D, Girish C, Harivenkatesh N, et al. Antihypertensive and pleiotropic effects of *Phyllanthus emblica* extract as an add-on therapy in patients with essential hypertension—A randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. *Phytotherapy Research*, 2021. IF:5.878
  26. Short-Chain Fatty Acid, Sodium Propionate, in Patients on Maintenance Hemodialysis: Beneficial Effects on Inflammatory Parameters and Gut-Derived Uremic Toxins, A Pilot Study (PLAN Study)[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2018. IF:5.688
  27. Peng J, Pan J, Mo J, et al. MPO/HOCl Facilitates Apoptosis and Ferroptosis in the SOD1 G93A Motor Neuron of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8217663. IF:5.604
  28. Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid- $\beta$  Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease[J]. *Molecular neurobiology*, 2021, 58(7):3208-3223. IF:5.59
  29. Aboulhoda, B. E., Rashed, L. A., Ahmed, H., et al. Hydrogen sulfide and mesenchymal stem cells-extracted microvesicles attenuate LPS-induced Alzheimer's disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(8):5994-6010 IF:5.546
  30. Liu W, Jia H, Guan M, et al. Discovery of novel tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site via virtual screening, structural optimization and antitumor evaluation. *Bioorg Chem.* 2022;118:105486. IF:5.508