

EZ- Acetylcholinesterase

Assay Kit

Metabolism Assay Kit
(Colorimetric)

Cat. No. DG-ACE100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Acetylcholinesterase (AChE)는 신경 반응과 기능에 관련하여 중요한 효소 중 하나로써 신경 전달 물질인 Acetylcholine을 가수 분해하는 serine protease 입니다. AChE의 비가역적 억제제는 근육 마비, 경련, 기관지의 수축 그리고 질식에 의한 사망을 초래할 수 있습니다.

EZ-Acetylcholinesterase Activity Assay Kit는 효소 활성의 모니터링을 위해 흡광(colorimetric)을 이용한 간단하고 민감한 방법을 제공합니다. 이 분석에서 AChE는 acetylcholine 기질을 choline으로 전환시키며, choline은 다시 choline oxidase (CO)에 의해 산화되어 probe에 발색을 유도하는 중간 물질(H_2O_2)를 생성합니다.

▪ Kit Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Cap Cord	Storage (reconstituted)
AChE Assay buffer	25mℓ	-	-20 °C, 2개월
AChE Enzyme mix (Lyophilized)	1 vial	Red	-20 °C, 2개월
AChE Substrate	5 vial	Blue	-20 °C, 2개월
AChE Probe	200μℓ	Yellow	-20 °C, 2개월
AChE Standard (50mM)	100μℓ	Green	-20 °C, 2개월

* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안됩니다.

* 본 제품으로 수행할 수 있는 test 수에 있어서 100 assays라 함은 96 well plate 1 well을 기준으로 100개의 well을 처리할 수 있는 시약을 제공한다는 의미입니다. 이 중 standard, blank, sample당 duplication 처리 등을 고려하면 실제 테스트 가능한 시료의 숫자는 20~40 samples의 범위에 있습니다. 제품설명서를 자세히 검토하고, 테스트하고자 하는 sample의 특성을 고려하여 소요되는 키트의 수를 결정하십시오.

▪ Sample type

- Serum, plasma, blood
- Liver, heart, kidney 등의 animal tissue와 배양 세포

▪ Preparation of Reagent

Solution	Preparation	Storage and Stability
AChE Enzyme mix	0.22mℓ AChE assay Buffer을 넣고 pipette을 이용하여 잘 혼합해 줍니다.	혼합한 용액은 -20℃에서 2개월 동안 안정합니다.
AChE Substrate	1 mℓ DMSO를 넣고 완전히 녹여 줍니다. <u>*kit에 DMSO는 포함되어 있지 않습니다.</u>	DMSO에 녹인 substrate는 <u>재사용 할 수 없습니다.</u> 실험시마다 새로 녹여서 사용하기 바랍니다.
AChE Probe	DMSO에 혼합된 상태입니다. 상온에서 충분히 녹여서 사용합니다.	사용하시고 남은 용액은 -20℃에 보관할 수 있으나 가급적 2개월 이내에 사용하십시오.
AChE Standard	상온에서 충분히 녹여서 사용합니다.	사용하시고 남은 용액은 -20℃에 보관할 수 있으나 가급적 2개월 이내에 사용하십시오.

* Assay buffer는 실험 전 상온에서 충분히 warming up 한 후 사용합니다.

차가운 상태의 buffer 사용시 enzyme 활성이 억제되어 결과에 영향을 줄 수 있습니다.

▪ General Protocol

1. Standard preparation

50mM AChE standard 10 μℓ와 assay buffer 990 μℓ를 섞어 0.5 mM AChE standard solution을 준비합니다. 96 well plate에 0.5 mM AChE standard solution 0, 2, 4, 6, 8, 10 μℓ를 분주하고 assay buffer로 최종 volume을 50 μℓ로 조정합니다.

Standard No.	Volume of 0.5mM AChE standard	Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard amount in well (nmol/well)
1	0 μℓ	50 μℓ	50 μℓ	0
2	2 μℓ	48 μℓ	50 μℓ	1
3	4 μℓ	46 μℓ	50 μℓ	2
4	6 μℓ	44 μℓ	50 μℓ	3
5	8 μℓ	42 μℓ	50 μℓ	4
6	10 μℓ	40 μℓ	50 μℓ	5

- * 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것을 권장합니다.
- * Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

2. Sample preparation

준비된 sample을 96 well plate에 1-5 μl 넣은 후, 최종 volume은 assay buffer로 50 μl 가 되도록 조정합니다. ($n \geq 2$)

- 1) $1-5 \times 10^6$ cells 또는 20 mg tissue sample 을 적당한 extraction buffer를 사용하여 추출합니다. Enzyme(AChE)의 활성을 분석하는 실험이므로 사용가능 한 extraction buffer는 non-denaturing buffer 를 사용하여야 합니다. 또는 차가운 0.1M phosphate buffer (pH 7.5) 를 넣고 얼음에서 균질화 (homogenization) 해줍니다. 추출된 샘플은 10,000 x g에서 5분 동안 원심 분리하여 상층액(supernatant)을 회수하여 사용합니다.
- 2) Serum, plasma 또는 blood는 전 처리 없이 분석 가능합니다.
- 3) 미지의 시료 또는 처음 측정하는 시료의 경우 측정 값이 standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 거친 후 사용을 권장합니다.
- 4) Triton X-100이 1% 이상 함유된 buffer는 분석을 방해할 수 있습니다.
- 5) 시료의 측정 값이 높은 background 값을 가지면 측정에 사용한 동일 양의 시료를 sample background control로 준비합니다.

3. Reaction mixture preparation

1 assay 기준의 volume이며, 실험에 사용하려는 assay양을 계산하여 여유 있게 reaction mix를 준비합니다.

Components	Reaction mixture	Background Reaction mixture
AChE Assay buffer	45 μl	46 μl
AChE Enzyme mix	2 μl	2 μl
AChE Probe	2 μl	2 μl
AChE Substrate	1 μl	-
Total	50 μl	50 μl

4. Reaction mixture를 AChE standard와 실험물질이 준비된 각 well에 Multi pipette을 이용하여 50 μ l씩 넣어준 후, 잘 섞어줍니다.

* background control 을 준비한 경우에는 background control well에 background mixture를 넣어줍니다.

5. Plate를 빛이 차단된 37°C 에서 30분간 반응시킨 후, 부드럽게 shaking 하여 Micro plate reader를 이용하여 흡광 570 nm 파장에서 측정합니다.

- 적정 Incubation time은 샘플 내의 AChE의 활성에 따라 다를 수 있습니다.
정확한 측정을 위해 Kinetic mode에서 OD값을 측정하고 그래프가 직선 구간을 이루는 범위에서 두 time point (T1, T2. $\Delta T = T2 - T1$)를 선택합니다.
(이때의 OD값을 A1, A2라고 합니다. $\Delta OD = A2 - A1$).
- Standard curve는 T2시점에서 end point mode로 작성하고 여기에 ΔOD 값을 적용하여 해당시간 동안 생성된 choline의 양을 계산하여줍니다. (B nmol).

▪ Calculation

5

1. 모든 측정 값에서 standard 1 값을 (blank) 빼줍니다.

* Blank = OD_{570nm} from AChE standard #1 (0 nmol AChE)

2. 각 standard well과 sample well의 duplicate 측정값을 평균합니다.

3. AChE standard 흡광도를 이용하여 standard curve를 그려줍니다.

(AChE standard Vs OD_{570nm})

4. Standard curve 에 sample 측정값 수치를 대입하여 반응에서 생성된 Choline의 양을 계산하여 줍니다. (B nmol).

* Background control을 설정한 경우 sample 측정값 에서 background control 측정값을 뺀 수치를 대입하여 Choline의 양을 계산하여 줍니다.

5. Kinetic assay 에서 구한 time point (ΔT) 와 위에서 구한 Choline의 양을 통해 아래와 같이 AchE의 활성을 구합니다

$$\text{AChE activity} = B/(\Delta T \times V) \times D = \text{nmol/min/ml} = \text{mU/ml}$$

B = standard curve에서 구한 choline의 양 (nmol)

ΔT = Reaction time (T₂-T₁, min)

V = 샘플 양 (ml)

D = 샘플 희석배율 (2배 희석한 경우 x1/2 이 아닌 x2로 계산합니다.)

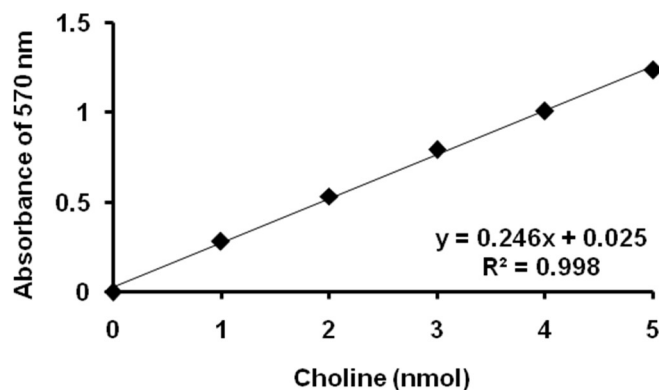


Fig. Choline standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Oxidative Stress Assay Kit	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
	EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-ABT400	400 Assay
	EZ-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric)	DG-GPX100	100 Assay
Metabolism Assay Kit	EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay
	EZ-Nitric Oxide Assay kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay
	EZ-Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)	DG-COL100	100 Assay
	EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric)	DG-ETH100	100 Assay

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Cell Proliferation / Cytotoxicity	EZ-Cytox	EZ-500	500 Assay
		EZ-1000	1000 Assay
		EZ-3000	3000 Assay
		EZ-5000	5000 Assay
		EZ-BULK150	10000 Assay
	EZ-Cytox ^{PLUS}	EZ-3000P	3000 Assay
Cell Cytotoxicity	EZ-LDH	DG-LDH500	500 Assay
		DG-LDH1000	1000 Assay