

丁酰胆碱酯酶(BchE)活性检测试剂盒

中文名称：丁酰胆碱酯酶(BchE)活性检测试剂盒

英文名称：Butyrylcholinesterase Activity Assay

产品包装：盒装

产品规格：100T/96S

储存条件：-20°C

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 125 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 12mL×1 瓶	2-8°C保存

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入 12mL 试剂一，充分溶解，-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融。

产品说明：

丁酰胆碱酯酶(Butyrylcholinesterase, BchE, EC3.1.1.8), 又称血浆胆碱酯酶, 假性胆碱酯酶, 是一种丝氨酸水解酶, 由肝脏合成后进入血液, 几乎存在于所有动物组织中。BchE 结构与乙酰胆碱酯酶(AchE)相似, 但底物特异性和抑制剂敏感性不同。与 AchE 相比, BchE 能够有效水解较大的胆碱酯, 如丁酰胆碱和苯甲酰胆碱, 而且可以清除有机磷类农药、氨基

甲酸酯类农药等神经毒剂的毒害作用。有研究表明，BchE 可作为阿尔茨海默病治疗的重要靶点。BchE 催化丁酰胆碱水解生成胆碱，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 412nm 处有吸收峰，通过测定 412nm 吸光度增加速率，计算 BchE 活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、分析天平、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量）

1. 组织样本：按照组织质量(g)：试剂一体积(mL)=1：5~10 比例加入试剂一(建议称取 0.1g 样本，加入 1.0mL 试剂一)，冰浴匀浆后，于 4℃,12000rpm 离心 10min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
2. 血清/血浆等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清置于冰上待测。
3. 细菌、细胞：按照细胞数量 10⁴ 个：试剂一体积(mL)500~1000:1 的比例(建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一)，冰浴超声波破碎细胞(功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min)，于 4℃,12000rpm 离心 10min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。

二、测定步骤：

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、操作表：(在微量玻璃比色皿/96孔板中加入下列试剂)

试剂名称(mL)	测定管	空白管
样本	10	-
蒸馏水	-	10
试剂二	100	100
试剂三	100	100

立即充分混匀后于 412nm 处测定 10s 时的吸光值 A1, 迅速置于 37°C 水浴或恒温培养箱 5min (酶标仪有控温功能可将温度调至 37°C), 拿出迅速擦干测定 5min 10s 时的吸光值 A2。计算 ΔA 测定 = A 测定 2 - A 测定 1, ΔA 空白 = A 空白 2 - A 空白 1, $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 空白。空白管只需测定 1-2 次。

三、BchE 活性计算

A、用微量玻璃比色皿测定：

1. 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：每 mg 蛋白每分钟催化产生 1nmolTNB 为 1 个酶活单位。BchE 活性 (U/mgprot) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \times F = 308.8 \times \Delta A \div Cpr \times F$ 。

2. 按照样本质量计算

活性单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmolTNB 为 1 个酶活单位。BchE 活性 (U/g 质量) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \times F = 308.8 \times \Delta A \div W \times F$ 。

3. 按照血清/血浆等液体体积计算

活性单位定义：每 mL 血清/血浆每分钟催化产生 1nmolTNB 为 1 个酶活单位。BchE 活性 (U/mL) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \times F = 308.8 \times \Delta A \times F$ 。

4. 按细菌/细胞数量计算

活性单位定义：每万个细胞每分钟催化产生 1nmolTNB 为 1 个酶活单位。BchE 活性 (U/10⁴cell) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \times F = 308.8 \times \Delta A \div N \times F$ 。TNB 摩尔

消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 1cm; V反总: 反应体系总体积, $0.21 \text{mL} = 2.1 \times 10^{-4} \text{L}$; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{mol} = 1 \times 10^9 \text{nmol}$; V样: 反应体系加入样本体积, 0.01mL; V样总: 加入试剂一体积, 1mL; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 5min; F: 样本稀释倍数; N: 细菌/细胞数量, 以万计。

B. 用 96 孔板测定:

将上述公式中的 d- 1cm 改为 d-0.6cm 进行计算即可。

注意事项:

1. 为保证结果准确, 请严格控制反应时间, 建议两人进行实验, 一人加样, 一人计时
2. 如果 ΔA 测定接近 ΔA 空白, 可以增加样本量后再进行测定; 如果 A2 测定大于 1 或 ΔA 测定大于 0.7, 建议将样本上清用试剂一适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。

实验实例:

1. 取 0.1018g 大鼠肝脏样本, 加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆, 离心后上清液用试剂一稀释 2 倍, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算: ΔA 测定 = A 测定 2 - A 测定 1 = $0.636 - 0.417 = 0.219$, ΔA 空白 = A 空白 2 - A 空白 1 = $0.188 - 0.180 = 0.008$, $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 空白 = 0.211, 按样本质量计算得(光径为 0.6cm 带入计算): BchE 活性(U/g 质量) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{反总} \times 10^9] \div (W \times V \text{样} \div V \text{样总}) \div T \times F = 2133.49 \text{U/g 质量}$ 。
2. 取人血清样本, 用试剂一稀释 16 倍, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算: ΔA 测定 = A 测定 2 - A 测定 1 = $0.960 - 0.299 = 0.661$, ΔA 空白 = A 空白 2 - A 空白 1 = $0.188 - 0.180 = 0.008$, $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 空白 = 0.653, 按液体体积计算得(光径为 0.6cm 带入计算): BchE 活性(U/mL) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{反总} \times 10^9] \div V \text{样} \div T \times F = 5377.237 \text{U/mL}$ 。