

# 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：50T/48S

储存条件：-20°C

检测方法：可见分光光度法

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 100 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 30mL×1 瓶	-20°C保存

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入 30mL 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、低温离心机、分析天平、水浴锅/恒温培养箱、1mL 玻璃比色皿、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°C, 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 10<sup>4</sup> 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°C, 12000rpm 离心 10min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。

##### 二、测定步骤:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
- 2、操作表: (在 1mL 玻璃比色皿中加入下列试剂)

试剂名称(mL)	测定管	空白管
样本	50	-
蒸馏水	-	50
试剂二	500	500
试剂三	500	500

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, 拿出迅速擦干测定 5min10s 时的吸光值 A2。计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 2 - A 测定 1,  $\Delta A$  空白 = A 空白 2 - A 空白 1,  $\Delta A = \Delta A$  测定 -  $\Delta A$  空白。空白管只需测定 1-2 次。

### 三、BchE 活性计算

#### 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。

$$\text{BchE 活性}(U/g \text{ 质量}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 308.8 \times \Delta A \div W \times F。$$

#### 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/10

$$^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 308.8 \times \Delta A \div N \times F。 \epsilon: \text{TNB 摩}$$

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,

1.05mL=1.05×10<sup>-3</sup>L; 109: 单位换算系数, 1mol=1×10<sup>9</sup>nmol; V 样: 反应体系加入样本体积, 0.05mL; 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。

#### 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。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 4 倍, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算: ΔA 测定=A 测定 2-A 测定 1=0.6807-0.3913=0.2894, ΔA 空白=A 空白 2-A 空白 1=0.3552-0.2931=0.0621, ΔA=ΔA 测定-ΔA 空白=0.2273, 按样本质量计算得: BchE 活性(U/g 质量)=[ΔA÷(ε×d)×V 反总×10<sup>9</sup>]÷(W×V 样÷V 样总)÷T×F=2757.966U/g 质量。

2. 取马血清样本, 用试剂一稀释 64 倍, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算: ΔA 测定=A 测定 2-A 测定 1=0.5100-0.3436=0.1664, ΔA 空白=A 空白 2-A 空白 1=0.3552-0.2931=0.0621, ΔA=ΔA 测定-ΔA 空白=0.1043, 按液体体积计算得: BchE 活性(U/mL)=[ΔA÷(ε×d)×V 反总×10<sup>9</sup>]÷V 样÷T×F=2061.302U/mL。