



## 丁酰胆碱酯酶(BchE)活性检测试剂盒(可见分光光度法)

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

储存条件：-20°C

产品包装：盒装

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

产品规格：50T/48S

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℃,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 $10^4$ 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、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。

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

$\times F。$

#### 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



$^{4}\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 308.8 \times \Delta A \div N \times F$ 。  $\epsilon$ : TNB 摩尔消光系数,  $13.6 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1\text{cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $1.05\text{mL} = 1.05 \times 10^{-3}\text{L}$ ;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 1 \times 10^9\text{nmol}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 反应体系加入样本体积,  $0.05\text{mL}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 加入试剂一体积,  $1\text{mL}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ;  $T$ : 反应时间,  $5\text{min}$ ;  $F$ : 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  $\Delta A$  测定接近  $\Delta A$  空白, 可以增加样本量后再进行测定; 如果  $A_2$  测定大于 1 或  $\Delta A$  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  $0.1018\text{g}$  大鼠肝脏样本, 加入  $1\text{mL}$  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  $1\text{mL}$  玻璃比色皿测得计算:  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}2} - A_{\text{测定}1} = 0.6807 - 0.3913 = 0.2894$ ,  $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白}2} - A_{\text{空白}1} = 0.3552 - 0.2931 = 0.0621$ ,  $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.2273$ , 按样本质量计算得:  $\text{BchE 活性(U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 2757.966\text{U/g 质量}$ 。

取马血清样本, 用试剂一稀释 64 倍, 按照测定步骤操作, 用  $1\text{mL}$  玻璃比色皿测得计算:  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}2} - A_{\text{测定}1} = 0.5100 - 0.3436 = 0.1664$ ,  $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白}2} - A_{\text{空白}1} = 0.3552 - 0.2931 = 0.0621$ ,  $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.1043$ , 按液体体积计算得:  $\text{BchE 活性(U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \times F = 2061.302\text{U/mL}$ 。