



## 丁酰胆碱酯酶(BchE)活性检测试剂盒(微量法)

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：微量法

有效期：6个月

产品规格：100T/96S

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℃,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 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

#### 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/10



$A_{490} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 308.8 \times \Delta A \div N \times F \epsilon$ : 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,  $0.21 \text{mL} = 2.1 \times 10^{-4} \text{L}$ ;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1 \text{mol} = 1 \times 10^9 \text{nmol}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 反应体系加入样本体积,  $0.01 \text{mL}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 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。

### B、用 96 孔板测定:

将上述公式中的  $d=1 \text{cm}$  改为  $d=0.6 \text{cm}$  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  $\Delta A$  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 2 倍，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算： $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定} 2} - A_{\text{测定} 1} = 0.636 - 0.417 = 0.219$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白} 2} - A_{\text{空白} 1} = 0.188 - 0.180 = 0.008$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.211$ ，按样本质量计算得(光径为  $0.6 \text{cm}$  带入计算):  $\text{BchE 活性(U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 2133.49 \text{U/g 质量}$ 。

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： $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定} 2} - A_{\text{测定} 1} = 0.960 - 0.299 = 0.661$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白} 2} - A_{\text{空白} 1} = 0.188 - 0.180 = 0.008$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.653$ ，按液体体积计算得(光径为  $0.6 \text{cm}$  带入计算):  $\text{BchE 活性(U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \times F = 5377.237 \text{U/mL}$ 。