

丁酰胆碱酯酶 (BchE) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA2119

产品规格: 100T/96S

产品简介:

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。

试剂盒的组成和配制:

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

溶液的配制:

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

所需的仪器和用品:

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, 具体比例可以参考文献)

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. 细胞/细菌: 按照细胞/细菌数量 10⁴ 个: 试剂一体积(mL)500~1000:1 的比例(建议 500 万细胞/细菌加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细胞/细菌(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 (μL)	测定管	空白管
样本	10	-
蒸馏水	-	10
试剂二	100	100
试剂三	100	100



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

立即充分混匀后于412nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37℃水浴或恒温培养箱5min(酶标仪有控温功能可将温度调至37℃)，拿出迅速擦干测定5min10s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， $\Delta A=A$ 测定-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1nmol TNB为1个酶活单位。

BchE活性(U/mg prot)=[$\Delta A \div (\xi \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9$] \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1nmol TNB为1个酶活单位。

BchE活性(U/g质量)=[$\Delta A \div (\xi \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9$] \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1nmol TNB为1个酶活单位。

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

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1nmol TNB为1个酶活单位。

BchE活性(U/ 10^4 cell)=[$\Delta A \div (\xi \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9$] \div (N $\times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \div T \times F = 308.8 \times \Delta A \div N \times F$

ξ : TNB摩尔消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1 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 mL ; $V_{\text{样总}}$: 加入试剂一体积, 1 mL ; Cpr蛋白浓度, mg/mL ; W : 样本质量, g ; T : 反应时间, 5 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 ΔA 测定接近 ΔA 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 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)=[$\Delta A \div (\xi \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9$] \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)=[$\Delta A \div (\xi \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9$] $\div V_{\text{样}} \div T \times F = 5377.237 \text{ U/mL}$ 。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com