

丁酰胆碱酯酶 (BchE) 活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

产品货号: BA2118

产品规格: 50T/48S

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100mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	液体30mL×1瓶	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前加入 30mL 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、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, 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 (μL)	测定管	空白管
样本	50	-



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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℃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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定2}} - A_{\text{测定1}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白2}} - A_{\text{空白1}}$ ， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。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1nmol TNB为1个酶活单位。

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

ϵ : TNB摩尔消光系数, 13.6×10^3 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^{-3} L; 10^9 : 单位换算系数, 1mol = 1×10^9 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。
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4倍，按照测定步骤操作，用1mL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：
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样 \div V样总) \div T \times F = 2757.966 U/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： $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定2}} - A_{\text{测定1}} = 0.5100 - 0.3436 = 0.1664$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白2}} - A_{\text{空白1}} = 0.3552 - 0.2931 = 0.0621$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.1043$ ，按液体体积计算得：
BchE活性(U/mL)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9$] \div V样 \div T \times F = 2061.302 U/mL。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com