

丁酰胆碱酯酶（BchE）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHD7-C24	丁酰胆碱酯酶（BchE）活性检测试剂 盒说明书	24T	微量法
AYHD7-C48		48T	

一、测定意义：

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。

二、测定原理：

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。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 80mL×1 瓶	液体 80mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂二配制：用时每瓶粉剂加入试剂一 30mL，混匀充分溶解，-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。			
试剂三	液体 25mL×1 瓶	液体 50mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 10mL×1 瓶	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品 (10μmol/mL)	液体 1mL×1 支	液体 1mL×2 支	2-8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

- 1、组织：按照组织质量（g）:提取液(mL)为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

2、细菌、细胞：按照细胞数量 10^4 个：提取液体积（mL）500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

3、血清（浆）等液体：直接测定。

五、测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 将10μmol/mL标准品用蒸馏水依次稀释至0、1、2、4、6、8μmol/mL，备用；
4. 操作表：

	测定管	对照管	空白管	标准管
样品（μL）	100	100	-	-
蒸馏水	-	-	100	
标准品（μL）	-	-	-	100
试剂二（μL）	500	500	500	500
试剂三（μL）	-	400	400	400
混匀，37℃孵育 10min				
试剂三（μL）	400	-	-	-
12000r 离心 3min，取上清				
上清液（μL）	100	100	100	100
试剂一（μL）	750	750	750	750
试剂四（μL）	150	150	150	150
混匀，空白管调零,10min 内于波长 405nm 处酶标仪测定各管吸光度。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$				

六、丁酰胆碱酯酶（BchE）活性计算：

1、标准曲线绘制：以吸光度值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线 $y = kx + b$ ，x 为吸光度值，y 为标准品浓度（μg/mL）。根据标准曲线，将 ΔA 带入公式计算出样本浓度（y，μg/mL）；

2、血清样本丁酰胆碱酯酶（BchE）计算

单位定义：每毫升血清每分钟催化产生 1μmol 巯基的量为一个活力单位。

计算公式：丁酰胆碱酯酶（BchE）（U/mL）= $y \div T$

3、组织、细胞样本 ACP 计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 $1\mu\text{mol}$ 巯基的量为一个活力单位。

计算公式： 丁酰胆碱酯酶 (BchE) ($\text{U}/\text{mg prot}$) $= y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每克组织催化产生 $1\mu\text{mol}$ 巯基的量为一个活力单位。

计算公式： 丁酰胆碱酯酶 (BchE) (U/g) $= y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 $1\mu\text{mol}$ 巯基的量为一个活力单位。

计算公式： 乙酰胆碱酯酶 (AchE) ($\text{U}/10^4 \text{ cell}$) $= y \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1mL；

$V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL；

T：反应时间，10min；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

500：细胞/细菌数，500 万；

七、 注意事项：

- 1、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；
- 2、测定过程中样本和工作液在冰上放置，以免变性和失活。