

乙酰胆碱转移酶（ChAT）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-T027 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

乙酰胆碱转移酶(Choline acetyltransferase ChAT, EC 2.3.1.6) 是乙酰胆碱 Ach 的合成酶，调节 Ach 的代谢。Ach 是调节食道平滑肌运动的主要的兴奋性神经递质。

ChAT 的测定是以乙酰辅酶 A 和胆碱为底物，在 ChAT 的作用下，反应的生成乙酰胆碱和辅酶 A，该产物和显色剂反应于 412nm 处有吸收峰，进而计算出 ChAT 的活力。

酶催化反应方程式： $\text{acetyl-CoA} + \text{choline} = \text{CoA} + \text{O-acetylcholine}$ 。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃ 避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用，可-20℃分装冻存。
试剂二	粉体 1 瓶	4℃ 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.3mL 蒸馏水溶解备用，-20℃保存。
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 4mL×1 瓶	4℃ 避光保存	1. 若凝固，可在 25℃水浴温育片刻至全部用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1mg×1 支	-20℃ 避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌或细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞，加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；

12000 rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min, 调节波长到 412 nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 或于水浴锅 (25°C) 孵育 15-30min 左右。

③ 在 96 孔板中依次加入:

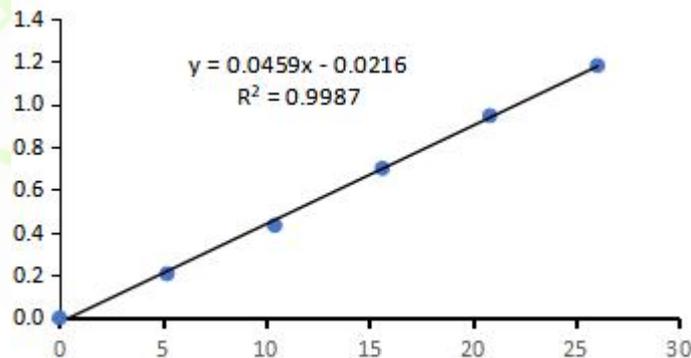
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	20	
试剂二	20	20
试剂三	100	120
混匀, 37°C孵育 30min		
试剂四	40	40
混匀, 静置 5min, 于 412nm 处读取吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】1. 若 ΔA 较小, 可以增加 37°C 保温反应时间 T (如增至 1 小时), 或增加样本量 V1 (由 20μL 增至 50μL, 则试剂三相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需重新代入公式计算。

2. ΔA 最好控制在标准曲线的线性范围内, 若 ΔA 的值超过 1, 可对样本进行稀释再测定, 稀释倍数 D 代入计算公式计算; 或减少样本量 V1 (如减至 5μL, 则试剂三相应增加), 或减少 37°C 反应时间 T (如减至 10min), 则改变后的 T、V1 和稀释倍数 D 需重新代入公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程为 $y = 0.0459x - 0.0216$; x 为标准品摩尔质量 (nmol), y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活性(nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0216) \div 0.0459] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 36.3 \times (\Delta A + 0.0216) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活性(nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0216) \div 0.0459] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 36.3 \times (\Delta A + 0.0216) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ChAT 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0216) \div 0.0459] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$=36.3 \times (\Delta A + 0.0216) \div 500 \times D$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

ChAT 活性(nmoL/min/mL)=[$(\Delta A + 0.0216) \div 0.0459$] $\div V1 \div T \times D = 36.3 \times (\Delta A + 0.0216) \times D$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.02mL;

T---反应时间, 30 min;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1; 500---细胞数量, 万; 辅酶 A 的分子量---Mr=767.53;

Cpr---上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 用前甩几下使粉体落入底部, 再加 0.5mL 蒸馏水溶解标准品 (母液需在两天内用完且-20℃保存), 标准品母液浓度为 2mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL, 加入 500uL 蒸馏水, 混匀得到 1mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据以下加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂三	140	140
试剂四	40	40
412nm 下读取各管吸光值, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		