

乙酰胆碱转移酶（ChAT）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-T027 分光法 24 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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃ 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，-20℃保存。
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 2.4mL 蒸馏水溶解备用，-20℃保存。
试剂三	液体 27mL×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融解后使用。 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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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：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℃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 可见分光光度计预热 30min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。

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

③ 在 EP 管中依次加入：

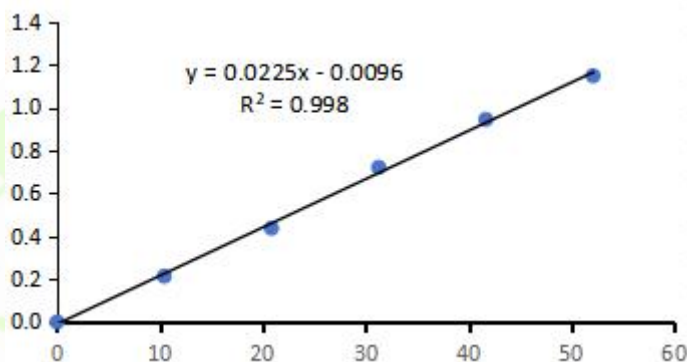
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	40	
试剂二	40	40
试剂三	500	540
混匀，37℃孵育 30min		
试剂四	80	80
混匀，静置 5min，将所有液体转移至 1mL 比色皿中，于 412nm 处读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. 若 ΔA 较小，可以增加 37℃ 保温反应时间 T（如增至 1 小时），或增加样本量 V1（由 80μL 增至 160μL，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 1.5，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 40μL，则试剂三相应增加），或减少 37℃ 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 $y = 0.0225x - 0.0096$ ；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。

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0096) \div 0.0225] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 18.5 \times (\Delta A + 0.0096) \div W \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活性 (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0096) \div 0.0225] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 18.5 \times (\Delta A + 0.0096) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0096) \div 0.0225] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 18.5 \times (\Delta A + 0.0096) \div 500 \times D \end{aligned}$$

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。

$$\text{ChAT 活性 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0096) \div 0.0225] \div V1 \div T \times D = 18.5 \times (\Delta A + 0.0096) \times D$$

W---样品质量, g; V---提取液体积, 1 mL;
V1---上清液体积 (mL), 0.08mL; 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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 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 200uL, 加入 600uL 蒸馏水, 混匀得到 0.5 mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
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	80	
蒸馏水		80
试剂三	580	580
试剂四	80	80
412nm 下读取各管吸光值, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		