

乙酰胆碱转移酶（ChAT）试剂盒说明书

(货号: BP10197W 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℃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℃）或于水浴锅（25℃）孵育 15-30min 左右。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

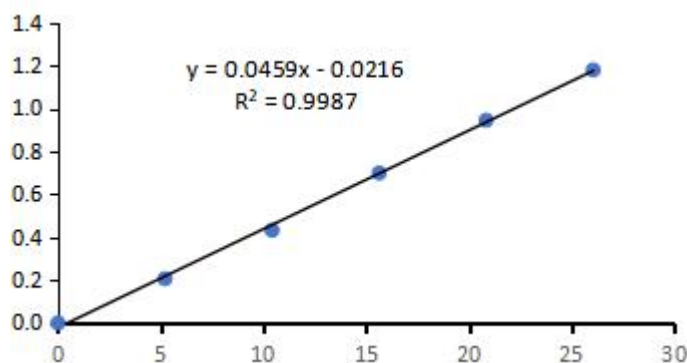
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	20	
试剂二	20	20
试剂三	100	120
混匀，37℃孵育 30min		
试剂四	40	40
混匀，静置 5min，于 412nm 处读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. 若 ΔA 较小，可以增加 37℃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℃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。

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

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。

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0216) \div 0.0459] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 36.3 \times (\Delta A + 0.0216) \div 500 \times D \end{aligned}$$

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。

ChAT 活性(nmol/min/mL)=[(ΔA+0.0216)÷0.0459]÷V1÷T×D =36.3×(ΔA+0.0216)×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, ΔA=A 测定-0 浓度管。		