

乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 试剂盒说明书

(货号: G0929W 微板法 48 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20°C 保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用,可-20°C 分装冻存。
试剂二	粉体 mg×1 支	4°C 保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 2.3mL 蒸馏水溶解备用,-20°C 保存。
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 4mL×1 瓶	4°C 保存	若凝固,可在 25°C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
标准品	粉体 1mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

四、乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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°C 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、上机检测:

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:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	20	
试剂二	20	20

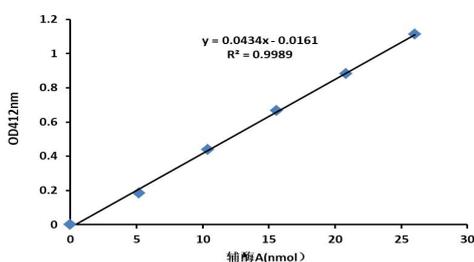
试剂三	100	120
混匀, 37°C 孵育 30min		
试剂四	40	40
混匀, 静置 5min, 于 412nm 处读取吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【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 20 μ L 增至 50 μ L, 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 5 μ L, 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 $y = 0.0434x - 0.0161$; 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。

$$\text{ChAT 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \div W \times D$$

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。

$$\text{ChAT 活性 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

$$= 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \div Cpr \times D$$

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。

$$\text{ChAT 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \div 500 \times D$$

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。

$$\text{ChAT 活性 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div V1 \div T \times D = 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \times D$$

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 制备标准品母液 (2mg/mL): 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°C 保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1mg/mL。
- 3 根据加样体系: 20 μ L 标准品+140 μ L 试剂三+40 μ L 试剂四, 于 412nm 处测定; 根据结果即可制作标准曲线。